

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VÂNIA DE CÁSSIA DA FONSECA BURGARDT

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS ENTRE
CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE: EFEITO DO pH E
CONCENTRAÇÃO**

CURITIBA

2012

VÂNIA DE CÁSSIA DA FONSECA BURGARDT

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS ENTRE
CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE: EFEITO DO pH E
CONCENTRAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr.^a Nina Waszczynskyj

Co-orientador: Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CURITIBA

2012

Burgardt, Vânia de Cássia da Fonseca

Estudo das interações físico-químicas entre caseinomacropeptídeo e carboximetilcelulose: efeito do pH e concentração / Vânia de Cássia da Fonseca Burgardt - Curitiba, 2012.

165 f. il.; tabs.

Orientadora: Dr.^a Nina Waszczynskyj

Co-orientador: Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Tese (Doutorado) – Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Inclui Bibliografia


1. Alimentos - composição. 2. Proteínas. 3. Carboidratos.
I. Waszczynsky, Nina. José. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 641.1

VÂNIA DE CÁSSIA DA FONSECA BURGARDT

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS ENTRE
CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE:
EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÃO**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão
formada pelos professores:


Orientadora: Prof^a. Dr^a. NINA WASZCZYŃSKYJ
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. IVAN GENNADIEVITCH EVSEEV
Unidade Francisco Beltrão, UTFPR


Prof^a. Dr^a. MARIA HELENE GIOVANETTI CANTERI
Unidade Ponta Grossa, UTFPR


Prof^a. Dr^a. MICHELE RIGÓN SPIER
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof^a. Dr^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 31 de agosto de 2012.

À minha família.
Em especial ao meu esposo Douglas e minha filha Ana Lara.
Por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e proteger sobre tudo nos momentos mais difíceis.

À minha família, em especial ao meu esposo, que teve muita paciência, amor e companheirismo durante todo o processo, muitas vezes me deu forças quando pensei em desistir.

À minha filha Ana Lara, que amo incondicionalmente.

Aos meus pais Iraci e Goretti, irmãos Neiro, Renato e Dayse, cunhadas Simone e Kenya, cunhado Maurício.

Aos meus sogros, que também considero como pai e mãe, Luís César e Marise, a minha cunhada Adriana e cunhado Ricardo.

Aos meus sobrinhos amados por todos os momentos de felicidade André, Gabriel e Fernanda.

Aos amigos verdadeiros e sempre presentes, Andrey e Elaine, que me receberam em sua casa inúmeras vezes.

À minha amiga especial Silvana Licodiedoff, por me ouvir, apoiar e me ajudar sempre.

Às amigas e colegas de trabalho Cleusa Inês Weber, Fabiane Picinin de Castro Cislighi e Andréia Badaró por compartilharem as angústias desse período comum á todas nós.

À minha orientadora Nina Waszczynskyj, minha mãe científica, por ter tanta paciência e disponibilidade em me ajudar sempre.

Ao professor Ivan Evseev por toda ajuda com as técnicas de ressonância magnética e difração de raios-X.

Às alunas e amigas Débora Francielly de Oliveira e Giovana de Bona Sartor, por estarem comigo lado a lado no laboratório.

Ao coordenador do curso de Tecnologia em Alimentos da UTFPR – campus Francisco Beltrão, Luciano Lucchetta, pelo apoio e compreensão durante essa jornada.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

A aplicação combinada de proteínas e carboidratos é prática comum na indústria de alimentos e tem como fim obter estabilidade ou até mesmo desenvolver produtos com características diferenciadas de textura, entre outras. Em razão do grande apelo funcional e tecnológico do caseinomacropeptídeo (CMP), como também da carboximetilcelulose (CMC) apresentar compatibilidade com número vasto de proteínas, conduziu-se a pesquisa em sistemas contendo ambos os componentes em diferentes pHs e concentrações. Foram encontradas fortes evidências da interação entre CMP e CMC em todos os pHs estudados (2, 4 e 6,5). O polissacarídeo adiou a precipitação do CMP em pH 4, devido à formação de complexos solúveis, também foi observada a formação de coacervados e em pH 2 houve formação de gel. Os espectros de análises no infravermelho (FTIR) demonstraram alterações visíveis nas bandas em diferentes pHs e concentrações, sendo a interação entre CMC e CMP eletrostática. Em pH 6,5, essa interação é confirmada pelo aumento na viscosidade das amostras com CMC. O comportamento reológico também foi modificado passando de dilatante para pseudoplástico na presença do polissacarídeo. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de baixo campo foi utilizada para avaliar o comportamento da água nos sistemas. Em paralelo, rampas de temperatura foram conduzidas nas amostras em pH 2 para identificar a formação de ligações hidrogênio nos géis. A viscosidade complexa (η^*) também foi avaliada em razão da frequência para essas amostras. Nesse pH há compartimentação da água e a adição de CMC restringe mais a movimentação, dependendo da concentração do peptídeo. Em pH 4, a água interage pouco com os demais componentes, devido à proximidade ao ponto isoelétrico do CMP e a uma maior afinidade com CMC. Em pH 6,5, a interação com água parece ser pouco significativa em termos de força de ligação, resultando em maior mobilidade das moléculas na presença do polissacarídeo. Em pH 2, também foram realizadas análises de grau de opacidade, tempo de gelificação, força de ruptura, microscopia eletrônica de varredura (MEV), reologia dinâmica e capacidade de retenção de água. Os resultados evidenciaram separação de fases em concentrações maiores que 4% de CMP confirmada nas imagens da microestrutura. Essa incompatibilidade ocasionou uma diminuição na força dos géis, porém nas amostras sem separação de fases há uma interação positiva entre o polissacarídeo e o peptídeo. A opacidade aumentou na presença do hidrocolóide. Foram ainda realizadas análises de FTIR e difração de raios-X (DRX), com o intuito de caracterizar a estrutura secundária do CMP e mudanças microestruturais com adição CMC nos géis em pH 2. Os resultados demonstraram que o peptídeo apresenta estrutura secundária pouco organizada, formada por α -hélice, folha- β (maior porção) e voltas- β . O grau de cristalinidade das amostras gel foi maior que na amostra não gelificada, ocorrendo um aumento mais significativo na presença de CMC, devido à maior organização microestrutural.

Palavras-chave: caseinomacropeptídeo, carboximetilcelulose, interação, pH, concentração, reologia, RMN, DRX, MEV, FTIR.

ABSTRACT

The joint application of proteins and carbohydrates is common place in the food industry so that stability could be achieved and products with different texture characteristics could be developed. Since caseinomacropeptide (CMP) and carboxymethylcellulose (CMC) are functionally and technologically compatible with a great number of proteins, researches has been carried out with systems containing the two components at different pH and concentrations. Evidence on the interaction between CMP and CMC was found in all pH under analysis (2, 4 and 6.5). The polysaccharide delayed CMP precipitation at pH 4 due to the formation of soluble complexes. The formation of co-acerbates was reported, coupled to gel formation at pH 2. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) showed visible changes in bands at different pH and concentrations, with an electrostatic interaction between CMC and CMP. Interaction was corroborated in pH 6.5 by an increase in viscosity of samples with CMC. The rheological behavior was also modified and shifted from expanding to pseudoplastic when the polysaccharide was present. Low-field nuclear magnetic resonance (NMR) evaluated the behavior of water in the systems. Temperature grades were placed concomitantly in pH 2 samples to identify the formation of hydrogen bonds in the gel. Complex viscosity (η^*) was also evaluated for the sample's frequency. Water compartmentalization existed in this pH and the addition of CMC restricted even more the movement, which depended on the peptide concentration. Water interacted only slightly with the other components at pH 4. This was due to the closeness of the CMP's isoelectric point and to a greater affinity with CMC. It seems that interaction with water at pH 6.5 was not very significant in terms of bond strength. The result was a higher mobility of molecules with the polysaccharide. Analyses on opacity degree, gelification time, rupture strength, scanning electron microscope, dynamic rheology and water retention capacity were also undertaken at pH 2. Results showed phase separation in concentrations that were higher than 4% of CMP corroborated by microstructure images. Incompatibility produced a decrease in gel strength although a positive reaction between the polysaccharide and the peptide existed in samples without phase separation. Opacity increased with hydrocolloid. FTIR and X-rays diffraction (XRD) analyses were also performed to characterize CMP's secondary structure and microstructural changes with the addition of CMC in gels at pH 2. Results showed that peptide had a slightly organized secondary structure formed by α -helix, β -sheet (great portion) and β -rounds. The gel samples' crystallinity degree was higher than that in the non-gelified sample, with a more significant increase with CMC, due to a greater microstructural organization.

Keywords: caseinomacropeptide, carboxymethylcellulose, interaction, pH, concentration, rheology, NMR, XRD, SEM, FTIR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESQUEMA ESTRUTURAL REPRESENTATIVO DA CLIVAGEM DA κ -CASEÍNA PARA FORMAÇÃO DA PARA- κ -CASEÍNA E CMP, COM OS SÍTIOS DE GLICOSILAÇÃO INICIAIS DA PROTEÍNA.....	30
FIGURA 2	ESTRUTURA PRIMÁRIA DO CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP) BOVINO PARA AS VARIANTES A E B.....	31
FIGURA 3	ESTRUTURA IDEALIZADA DA CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA COM GS:1,0.....	34
FIGURA 4	PRINCIPAIS TENDÊNCIAS NO COMPORTAMENTO DE MISTURAS DE PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS.....	36
FIGURA 5	ESQUEMA DE AGREGAÇÃO DOS MONÔMEROS DURANTE A TRANSIÇÃO SOL-GEL.....	38
FIGURA 6	MODELO DEFINIDO POR ISAAC NEWTON.....	41
FIGURA 7	ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DOS FLUIDOS SEGUNDO COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	43
FIGURA 8	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE FLUIDOS NEWTONIANOS.....	44
FIGURA 9	CURVAS DE FLUXO PARA FLUIDOS NEWTONIANOS E NÃO – NEWTONIANOS INDEPENDENTES DO TEMPO.....	45
FIGURA 10	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE FLUIDOS NÃO-NEWTONIANOS DEPENDENTES DO TEMPO.....	48
FIGURA 11	REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS MÓDULOS COMPLEXO, ELÁSTICO E VISCOSO.....	50
FIGURA 12	DIAGRAMA VISUAL PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CMP-CMC EM pH 2: X PRECIPITADO, ▲ GEL; pH 4: ● COACERVADO, ▲ GEL, X PRECIPITADO E pH 6,5: ■ SOLUÇÃO.....	69
FIGURA 13	MUDANÇA NOS VALORES DE Abs_{664}/Abs_{615} PARA AS SOLUÇÕES COM 0,001% DE AZUL DE METILENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CMC (a); OU PARA AS MISTURAS 0,001% AZUL DE METILENO - 0,25% CMC EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CMP (b) EM pH 2 (■); 4 (●) E 6,5 (▲) À TEMPERATURA DE 25°C. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO (N=3).....	71
FIGURA 14	ESPECTRO DE FTIR PARA CMP.....	73
FIGURA 15	ESPECTRO DE FTIR PARA CMC.....	75
FIGURA 16	ESPECTROS COMPARATIVOS PARA AS AMOSTRAS COM MESMA CONCENTRAÇÃO DE CMP (4%) E CMC (0%) EM pH: 2 – (F1) , 4 – (F10) E 6,5 – (F19).....	76
FIGURA 17	COMPARAÇÃO ENTRE ESPECTROS DAS TRÊS AMOSTRAS EM MESMA CONCENTRAÇÃO DE CMP E pH, SENDO A PRIMEIRA SEM ADIÇÃO DE CMC, A SEGUNDA COM 0,25% E A TERCEIRA COM 0,50%..	79

FIGURA 18	CURVAS DE FLUXO PARA AS SOLUÇÕES CONTENDO CMP (2% ■, 4% ●, 6% ▲, 8% ▼ e 10% ◀) (a), MAIS 0,25% (b) E 0,50% (c) DE CMC.....	84
FIGURA 19	VISCOSIDADE APARENTE PARA AS SOLUÇÕES CONTENDO CMP (2% ■, 4% ●, 6% ▲, 8% ▼ e 10% ◀) (a), MAIS 0,25% (b) E 0,50% (c) DE CMC	87
FIGURA 20	VALORES DE T_2 PARA AS AMOSTRAS GELIFICADAS EM pH 2.....	103
FIGURA 21	VISCOSIDADE COMPLEXA DAS AMOSTRAS F1-3 (a), F4-6 (b) E F7-9 (c). F1, 4 E 7: SEM CMC (□), F2, 5 E 8: 0,25% DE CMC (■) E F3, 6 E 9: 0,50% DE CMC (■).....	104
FIGURA 22	RAMPA DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS F1 (A), F2 (B) E F3 (C). G' (■), G'' (○), AQUECIMENTO 20 - 100°C E RESFRIAMENTO DE 100 - 20°C (—).....	106
FIGURA 23	RAMPA DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS F4 (A), F5 (B) E F6 (C). G' (■), G'' (○), AQUECIMENTO 20 - 100°C E RESFRIAMENTO DE 100 - 20°C (—).....	107
FIGURA 24	RAMPA DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS F7 (A), F8 (B) E F9 (C). G' (■), G'' (○), AQUECIMENTO 20 - 100°C E RESFRIAMENTO DE 100 - 20°C (—).....	108
FIGURA 25	VALORES DE T_2 PARA AS AMOSTRAS EM pH 4.....	109
FIGURA 26	VALORES DE T_2 PARA AS AMOSTRAS EM pH 6,5.....	110
FIGURA 27	VALORES DE T_2 COMPARATIVOS ENTRE AS AMOSTAS.....	112
FIGURA 28	TAXA DE GELIFICAÇÃO (V_{GEL}) PARA OS SISTEMAS A 25°C. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO (N=12).....	125
FIGURA 29	MICROESTRUTURA DAS AMOSTRAS G3 A G9 (6000X DE AUMENTO)...	128
FIGURA 30	MUDANÇA NA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA DAS AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE CMC.....	130
FIGURA 31	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CMC NOS ESPECTROS MECÂNICOS DE GÉIS COM 4% CMP, SENDO G1 COM 0% (A), G2 COM 0,25% (B) E G3 COM 0,50% DE CMC (C). MÓDULO ELÁSTICO (G') (■), MÓDULO VISCOSO (G'') (○) E $TAN \delta$ (▲). BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO.....	132
FIGURA 32	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CMC NOS ESPECTROS MECÂNICOS DE GÉIS COM 6% CMP, SENDO G4 COM 0% (A), G5 COM 0,25% (B) E G6 COM 0,50% DE CMC (C). MÓDULO ELÁSTICO (G') (■), MÓDULO VISCOSO (G'') (○) E $TAN \delta$ (▲). BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO.....	134
FIGURA 33	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CMC NOS ESPECTROS MECÂNICOS DE GÉIS COM 8% CMP, SENDO G7 COM 0% (A), G8 COM 0,25% (B) E G9 COM 0,50% DE CMC (C). MÓDULO ELÁSTICO (G') (■), MÓDULO VISCOSO (G'') (○) E $TAN \delta$ (▲). BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO.....	135
FIGURA 34	FORÇA DE RUPTURA DOS GÉIS COM E SEM CMC. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO.....	136
FIGURA 35	AUMENTO DA OPACIDADE DOS GÉIS NA PRESENÇA DE CMC. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO.....	138

FIGURA 36	SINAL SIMULADO (-o-) BASEADO EM ESPECTRO DE CMP COM ESTRUTURA PREDOMINANTE EM FOLHA β , 2 ^a DERIVADA (-●-) E OS COMPONENTES INDIVIDUAIS DO AJUSTE (—).....	149
FIGURA 37	DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA CMC E CMP.....	150
FIGURA 38	DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA G1, G2 E G3.....	152
FIGURA 39	DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA G4, G5 E G6.....	153
FIGURA 40	DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA G7, G8 E G9.....	154

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	COMPOSIÇÃO TEÓRICA DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NO CMP.....	32
TABELA 2	BANDAS (NÚMERO DE ONDAS EM cm^{-1}) OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS.....	78
TABELA 3	ANOVA/MANOVA PARA OS PARÂMETROS REOLÓGICOS k E n	82
TABELA 4	COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS k E n ENTRE AS AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CMP E CMC.....	83
TABELA 5	ANOVA/MANOVA PARA VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) À TAXA DE CISALHAMENTO DE 50 s^{-1}	85
TABELA 6	VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) À TAXA DE CISALHAMENTO DE 50 s^{-1}	85
TABELA 7	RESULTADOS PARA AJUSTE DAS CURVAS NA REGIÃO $1800\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$	148
TABELA 8	GRAUS DE CRISTALINIDADE E OPACIDADE PARA AS AMOSTRAS.....	155

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	TIPOS DE DISPERSÕES COLOIDAIIS EM ALIMENTOS.....	37
QUADRO 2	EQUAÇÃO CONSTITUTIVA PARA ALGUNS MODELOS REOLÓGICOS E OS VALORES DE τ_0 , k E n PARA ESSES FLUIDOS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA/MANOVA	Análise de variância multivariada
AM	Azul de metileno
aCMP	Caseinomacropéptídeo não glicosilado
CMC	Carboximetilcelulose
CMP	Caseinomacropéptídeo
CRA	Capacidade de retenção de água
DRX	Difração de raios-X
FTIR	Espectrofotometria no Infravermelho por transformada de Fourier
gCMP	Caseinomacropéptídeo glicosilados
Lys	Lisina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
RMN	Ressonância magnética nuclear
Ser	Aminoácido serina
Thr	Aminoácido treonina
Phe	Aminoácido fenilalanina
Met	Aminoácido metionina

LISTA DE SÍMBOLOS

τ	Tensão de cisalhamento
k	Coeficiente de consistência
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
n	Índice de comportamento
η_{ap}	Viscosidade aparente
η^*	Viscosidade dinâmica complexa
G'	Módulo elástico ou de armazenagem
G''	Módulo viscoso ou de dissipação
G^*	Módulo de cisalhamento complexo
τ°	Tensão total
γ°	Deformação do sistema
$\tan \delta$	Tangente de delta
Pa	Pascal
n	Inclinação ou coeficiente angular da reta
f	Frequência de oscilação
k	Constante
nm	Nanômetro
Abs_{664}	Absorbância a 664 nanômetros
Abs_{615}	Absorbância a 615 nanômetros
NH_3	Amônia
H^+	Íons hidrogênio
COO^-	Grupos carboxílicos negativamente carregados
Na^+	Íons sódio
O-H	Grupos hidroxilas
N-H	Grupo amida

C=O	Grupo carbonila
PO ₄	Grupo fosfato
CH ₃	Grupo metil
CO ₂	Dióxido de carbono
B ₀	Campo magnético externo
¹ H	Átomo de hidrogênio com 1 próton
ω	Frequência assumida na mudança do eixo de rotação dos prótons
γ	Razão giromagnética
T ₂	Relaxação transversal, spin-spin
T ₁	Relaxação longitudinal, spin-rede
M _{xy}	Magnetização transversal
M ₀	Magnetização inicial
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
mm/s	Milímetro por segundo
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de ionização de carboidratos
M	Molaridade
gf	Grama-força
N/mm ²	Newton por milímetro quadrado
σ	Força de ruptura
F	Força máxima
R	Raio do probe
Op	Opacidade do gel

Opb	Opacidade do gel sobreposto a um fundo branco
Opn	Opacidade do gel sobreposto a um fundo negro
V_{til}	Taxa de gelificação
t_{til}	Tempo de gelificação
θ	Ângulo do detector com relação ao feixe
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
OBJETIVOS.....	23
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos.....	23
JUSTIFICATIVA.....	24
COMPOSIÇÃO DA TESE.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	29
1.1 CASEINOMACROPEPTÍDEO.....	30
1.2 CARBOXIMETILCELULOSE.....	32
1.3 INTERAÇÕES PROTEÍNA-POLISSACARIDEO.....	34
1.4 SISTEMAS COLOIDAIIS.....	36
1.4.1 Sol.....	37
1.4.2 Gel.....	38
1.5 REOLOGIA.....	40
1.5.1 Fluidos Newtonianos.....	44
1.5.2 Fluidos não-Newtonianos.....	44
1.5.2.1 Fluidos não-Newtonianos independentes do tempo.....	46
1.5.2.2 Fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo.....	47
1.5.2.3 Fluidos viscoelásticos.....	48
1.5.3 Modelos reológicos.....	51
REFERÊNCIAS.....	53
CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E DO pH NA INTERAÇÃO ENTRE CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE.....	60
RESUMO.....	61
2.1 INTRODUÇÃO.....	62
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.2.1 Material.....	64
2.2.2 Métodos.....	64
2.2.2.1 Preparo das amostras.....	64
2.2.2.2 Diagrama visual.....	64
2.2.2.3 Método espectrofotométrico para avaliação da interação CMP-CMC....	64
2.2.2.4 Espectrometria no infravermelho (FTIR)	65
2.2.2.5 Comportamento reológico das soluções.....	66
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
2.3.1 Diagrama visual.....	67

2.3.2 Método espectrofotométrico para avaliação da interação CMP-CMC em solução.....	70
2.3.3 Análises de infravermelho (FTIR)	72
2.3.3.1 Caracterização do CMP.....	72
2.3.3.2 Caracterização CMC.....	74
2.3.3.3 Influência do pH e da concentração dos componentes na interação CMP-CMC.....	75
2.3.4 Comportamento reológico.....	82
2.4 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
CAPÍTULO 3 - RELAXAÇÃO DE PRÓTONS ¹H POR RMN DOS SISTEMAS COM CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE.....	95
RESUMO.....	96
3.1 INTRODUÇÃO.....	97
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
3.2.1 Material.....	99
3.2.2 Métodos.....	99
3.2.2.1 Preparo das amostras.....	99
3.2.2.2 Ressonância magnética nuclear de baixo campo.....	100
3.2.2.3 Medidas reológicas.....	100
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
3.3.2 Amostras gelificadas em pH 2.....	102
3.3.3 Amostras em pH 4.....	109
3.3.4 Amostras em pH 6,5.....	110
3.3.5 Mudanças no tempo de relaxação transversal (T ₂) com o pH.....	111
3.4 CONCLUSÃO.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CARBOXIMETILCELULOSE EM GÉIS ÁCIDOS DE CASEINOMACROPEPTÍDEO: PROPRIEDADES REOLÓGICAS, ÓTICAS E MICROESTRUTURA.....	117
RESUMO.....	118
4.1 INTRODUÇÃO.....	119
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	120
4.2.1 Material.....	120
4.2.2 Métodos.....	120
4.2.2.1 Preparo das amostras.....	120
4.2.2.2 Transição sol-gel	120
4.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	121
4.2.2.4 Capacidade de retenção de água (CRA)	121
4.2.2.5 Medidas reológicas.....	122

4.2.2.6 Força de ruptura do gel.....	122
4.2.2.7 Grau de opacidade.....	123
4.2.2.8 Análise estatística.....	123
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
4.3.1 Efeito da adição de CMC no tempo de gelificação dos sistemas.....	124
4.3.2 Microestrutura dos géis.....	126
4.3.3 Capacidade de retenção de água dos géis.....	129
4.3.4 Influência da adição de CMC na viscoelasticidade dos géis de CMP.....	130
4.3.5 Força de ruptura e opacidade dos géis.....	136
4.4 CONCLUSÃO.....	138
REFERÊNCIAS.....	140
CAPÍTULO 5 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA E MUDANÇAS NA CRISTALINIDADE DOS GÉIS DE CASEINOMACROPEPTÍDEO NA PRESENÇA DE CARBOXIMETILCELULOSE.....	143
RESUMO.....	144
5.1 INTRODUÇÃO.....	145
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	146
5.2.1 Material.....	146
5.2.2 Métodos.....	146
5.2.2.1 Preparo das amostras.....	146
5.2.2.2 Espectrometria no infravermelho (FTIR)	146
5.2.2.3 Difração de raios – X (DRX)	147
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	148
5.3.1 Estrutura secundária do CMP.....	148
5.3.2 Difração de raios – X (DRX)	149
5.4 CONCLUSÃO.....	156
REFERÊNCIAS	158
CONCLUSÃO GERAL.....	160
ANEXOS.....	161

INTRODUÇÃO

O caseinomacropeptídeo (CMP) é um peptídeo terminal composto por 64 aminoácidos resultantes da clivagem da κ -caseína na ligação Phe 105 - Met 106 durante a fabricação de queijo utilizando quimosina, sendo liberado no soro e o restante da κ -caseína precipitada na massa (DELFOUR et al., 1965). Depois da β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, é a proteína mais abundante, representando entre 20 a 25% das proteínas totais quando obtido a partir do soro de queijo.

Suas propriedades funcionais o tornam um componente de grande interesse no desenvolvimento de novos produtos com apelo à saúde, como exemplo disso tem-se a possibilidade de utilização em alimentos destinados a portadores de fenilcetonúria, possui ainda efeito antitrombótico e imunomodulador (CHABANCE et al., 1995 e 1998; OTANI; MONNAI, 1995; OTANI et al., 1995; OTANI; HORIMOTO; MONNAI, 1996; MONNAI; OTANI, 1997; MATIN; OTANI, 2000). Além dessas propriedades, o CMP possui também propriedades tecnológicas, como capacidade emulsificante e estabilização de emulsões, formação de gel e espuma, entre outras (BURTON; SKUDDER, 1987; CHOBERT et al., 1989; MARSHALL, 1991; AHMED; RAMASWAMY, 2003; MARTÍN-DIANA; FRÍAS; FONTECHA, 2005).

A estabilização de muitos produtos alimentícios se dá graças a diferentes combinações de hidrocolóides e proteínas; a interação entre esses no alimento é dependente de diversos fatores, como pH, concentração, temperatura, força iônica e interação com outros componentes no alimento (DOUBLIER et al., 2000; CHANTRAPORNCHAI, McCLEMENTS, 2002 e 2006; DICKINSON, 2008; FIROOZMAND; MURRAY; DICKINSON, 2009). Em emulsões, as propriedades físico-químicas são resultado das características e conteúdo das gotas, como tamanho, carga, propriedades interfaciais, interações e concentração, sendo esta última capaz de influenciar na estabilidade, características sensoriais e valor nutricional (DICKINSON, 1992; FRIBERG; LARSSON; SJOBLUM, 2004; McCLEMENTS, 2005).

Considerando o exposto, o desenvolvimento de novos produtos ou mesmo a aplicabilidade do caseinomacropeptídeo na indústria de alimentos,

exige estudos mais apurados a respeito do comportamento desse peptídeo em sistemas múltiplos, o que até o momento foi pouco estudado. Em presença de polissacarídeos, como a carboximetilcelulose, pode haver compatibilidade ou incompatibilidade dependendo das condições empregadas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as interações entre caseinomacropeptídeo (CMP) e carboximetilcelulose (CMC) em sistemas com diferentes concentrações e pHs.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar as interações físico-químicas entre caseinomacropeptídeo (CMP) e carboximetilcelulose (CMC) influenciadas por diferentes condições de pH e concentração.

Objetivos Específicos

- Construir um diagrama visual em diferentes pHs (2, 4 e 6,5) e diferentes concentrações de CMP (2-10%) e CMC (0; 0,25 e 0,50%);
- Avaliar a interação do peptídeo e do polissacarídeo nos sistemas com auxílio do método espectrofotométrico;
- Utilizar a espectrometria no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar o CMP e CMC e verificar a interação desses componentes nos sistemas;
- Caracterizar reologicamente as amostras em condições dinâmicas e estacionárias;
- Usar a técnica de ressonância magnética nuclear de baixo campo para obter o tempo de relaxação transversal (T_2) das amostras, visando compreender a interação da água com os componentes;
- Avaliar a influência da adição de CMC, nas concentrações 0; 0,25 e 0,50%, no tempo de gelificação dos géis de CMP (4-8%);

- Observar a microestrutura dos géis com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar a capacidade de retenção de água nos sistemas gelificados;
- Avaliar a influência da adição de CMC, nas concentrações 0; 0,25 e 0,50%, na força dos géis de CMP (4-8%);
- Determinar o grau de opacidade dos géis;
- Verificar a estrutura secundária do peptídeo, a partir do ajuste da curva da banda de amida I nos espectros obtidos por FTIR;
- Utilizar difração de raio-X para avaliar as características estruturais e o grau de cristalinidade desses géis.

JUSTIFICATIVA

Deve-se considerar que cada vez mais a indústria busca produzir alimentos altamente nutritivos e assegurar a preservação do meio ambiente. Nesse contexto, várias pesquisas foram desenvolvidas com o soro de leite, subproduto resultante da produção de queijo, com alta capacidade poluente e cujos componentes apresentam grande interesse tecnológico. Dentre estes está o CMP, peptídeo com grande potencial devido às suas propriedades funcionais e tecnológicas, mas ainda pouco explorado como ingrediente.

A escolha das condições do estudo baseou-se em evidências descritas por outros trabalhos. Segundo a revisão escrita por Thoma-Worringer, Sørensenb e Lopez-Fandino (2006), muitas pesquisas foram realizadas com o caseinomacropéptídeo, no entanto pouco se conhece a respeito de uma série de aspectos, inclusive a sua interação com outros componentes em alimentos.

Embora a interação entre proteínas e polissacarídeos aniônicos pareça totalmente previsível em pH abaixo do ponto isoelétrico, no caso do CMP é um pouco mais complexo. Isso devido à glicosilação, como também às variantes genéticas A e B, com pontos isoelétricos distintos (FARRELL Jr et al., 2004, MIKKELSEN et al., 2005). De acordo com Martinez, Farías e Pilosof (2011), em pH 2, o peptídeo forma gel, mas as forças hidrofóbicas e eletrostáticas responsáveis pela auto-montagem da estrutura são mais fracas que em pHs

mais elevados. Deve-se mencionar também que o ácido siálico, polissacarídeo presente na forma glicosilada (gCMP), possui pKa próximo a pH 2. Em razão dessas características, a interação do caseinomacropeptídeo com carboximetilcelulose em pH 2 torna-se legítima.

Os pHs 4 e 6,5 são importantes, pois o primeiro está próximo ao ponto isoelétrico do peptídeo (KREUß; STRIXNER; KULOZIK, 2009). No segundo, de acordo com inúmeras pesquisas na área, há favorecimento da incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos aniônicos, devido à proteína adquirir carga negativa em pH próximo à neutralidade (TOLSTOGUZOV, 1997; GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; PLUCKNETT et al., 2001).

COMPOSIÇÃO DA TESE

A tese é composta por cinco capítulos.

O primeiro capítulo apresenta a explanação científica do tema, a revisão de literatura e a contextualização do objeto em estudo com informações teóricas que irão subsidiar os resultados e a discussão.

O segundo abrange um estudo amplo da interação de caseinomacropeptídeo e carboximetilcelulose em diferentes condições de pH e concentração, o qual fundamentou os demais capítulos.

Além do comportamento do CMP e CMC, é importante entender a participação da água nos sistemas em diferentes pHs e concentração, por esse motivo realizou-se esse estudo no terceiro capítulo.

No quarto e quinto capítulos, a busca foi por uma investigação mais estreita nas amostras gelificadas em pH 2. Sendo que no quarto capítulo avaliaram-se as propriedades reológicas, óticas e associadas à microestrutura. No quinto capítulo a estrutura secundária e a cristalinidade foram determinadas.

REFERÊNCIAS

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1535-1540, 2003.

BURTON, J.; SKUDDER, P. J. Whey proteins. UK Patent Application GB 2188526 A1, 1987.

CHABANCE, B.; JOLLES, P.; IZQUIERDO, C.; MAZOYER, E.; FRANCOUAL, C. DROUET, L. Characterization of an antithrombotic peptide from k-casein in newborn plasma after milk ingestion. **British Journal of Nutrition**, v. 3, p. 583-590, 1995.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v. 80, p. 155-165, 1998.

CHANTRAPORNCHAI, W.; McCLEMENTS, D. J. Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 467-476, 2002.

CHOBERT, J. M.; TOUATI, A.; BERTRANDHARB, C.; DALGALARRONDO, M.; NICOLAS, M. G. Solubility and emulsifying properties of k-casein and its caseinomacropeptide. **Journal of Food Biochemistry**, v. 13, p. 457-473, 1989.

DELFOUR, A.; JOLLES, J.; ALAIS, C.; JOLLES, P. Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.19, p.452-455,1965.

DICKINSON, E. **An Introduction to Food Colloids**. Oxford:Oxford Science Publishers, 1992.

DICKINSON, E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. **Soft Matter**, v. 4, p. 932-942, 2008.

DOUBLIER, J.-L.; GARNIER, C.; RENARDA, D.; SANCHEZB, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 202-214, 2000.

FARRELL Jr., H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E.M; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FRIBERG, S.; LARSSON, K.; SJOBLÖM, J. **Food Emulsions**. New York: Marcel Dekker, 2004.

FIROOZMAND, H.; MURRAY, B. S.; DICKINSON, E. Microstructure and rheology of phase-separated gels of gelatin + oxidized starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1081–1088, 2009.

GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 145–158, 1997

KREUß, M.; STRIXNER, T.; KULOZIK, U. The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1818–1826, 2009.

MARSHALL, S. C. Casein macropeptide from whey-A new product opportunity. **Food Research Quarterly**, v. 51, p. 86–91, 1991.

MARTÍN-DIANA, A. B.; FRÍAS, J.; FONTECHA, J. Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 363–367, 2005.

MARTINEZ, M. J.; FARÍAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 869–867, 2011.

MATIN, M. A.; OTANI, H. Release of cytotoxic glycopeptides from human acid casein fraction by the action of stomach proteinases. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 6–10, 2000.

McCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: Principles, practice and techniques**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 621–625, 2006.

MIKKELSEN, T. L.; FRØKIÆR, H.; TOPP, C.; BONOMI, F.; IAMETTI, F.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P., & BARKHOLT, V. Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4228–4238, 2005.

MONNAI, M.; OTANI, H. Effect of bovine κ -caseinoglycopeptide on secretion of interleukin-1 family cytokines by P388D1 cells, a line derived from mouse monocyte/macrophage. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 192–196, 1997.

OTANI, H.; MONNAI, M.; KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, H.; TANIMOTO, M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine κ -caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 349–357, 1995.

OTANI, H.; MONNAI, M. Induction of an interleukin-1 receptor antagonist-like component produced from mouse spleen cells by bovine k-caseinoglycopeptide. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p.1166-1168, 1995.

OTANI, H.; HORIMOTO, Y.; MONNAI, M. Suppression of interleukin-2 receptor expression on mouse CD4+T cells by bovine k-caseinoglycopeptide. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p.1017-1019, 1996.

PLUCKNETT, K. P.; POMFRET, S. J.; NORMAND, V.; FERDINANDO, D.; VEERMAN, C.; FRITH, W. J., et al. Dynamic experimentation on the confocal laser scanning microscope: Application to soft-solid, composite food materials. **Journal of Microscopy**, v. 201, p. 279–290, 2001.

THOMA-WORRINGER, C.; SORENSEN, J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1324–1333, 2006.

TOLSTOGUZOV, V. Protein–polysaccharide interactions. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, Inc, p.171-198, 1997.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CASEINOMACROPEPTÍDEO

O termo caseinomacropeptídeo (CMP) designa um grupo de polipeptídeos heterogêneos com duas variantes genéticas: A e B; e modificações pós-traducionais, como fosforilação e glicosilação (FARRELL Jr et al., 2004; MIKKELSEN et al., 2005). As modificações pós-traducionais resultam em uma porção não glicosilada (aCMP) e outra glicosilada (gCMP), sendo esta última responsável por 50% do CMP bovino total, o qual também é chamado glicomacropeptídeo; e insere a totalidade dos carboidratos presentes na κ -caseína (FIGURA 1), sendo o carboidrato predominante o ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) (COOLBEAR; ELGAR; AYERS, 1996; MOLLÉ; LÉONIL, 2005).

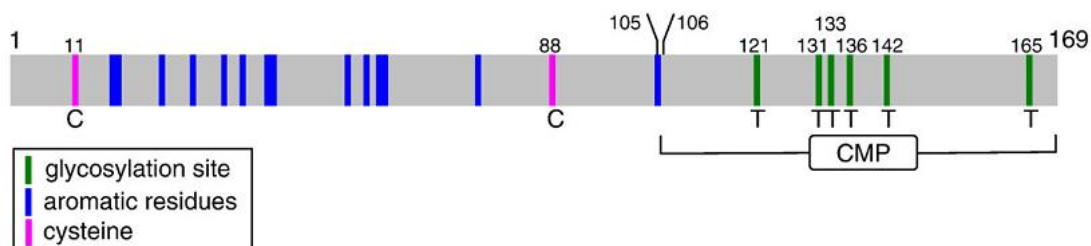


FIGURA 1 – ESQUEMA ESTRUTURAL REPRESENTATIVO DA CLIVAGEM DA κ -CASEÍNA PARA FORMAÇÃO DA PARA- κ -CASEÍNA E CMP, O QUAL INCLUI TODOS OS SÍTIOS DE GLICOSILAÇÃO INICIAIS DA PROTEÍNA

FONTE: LEONIL et al. (2008).

Além do ácido siálico (NeuAc), estão presentes *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) e galactose (Gal) (MANSO; LOPEZ-FANDINO, 2004), que podem ocorrer como cinco cadeias de sacarídeos diferentes, ligados a resíduos de serina ou treonina da cadeia principal do peptídeo por ligações covalentes-glicosídicas (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996; BRODY, 2000). Essas cadeias de sacarídeos e suas respectivas percentagens foram identificadas por Saito e Itoh (1992) :

- Monossacarídeo: GalNAc-O-R (0,8%),
- Dissacarídeo: Gal β 1-3 + GalNAc-O-R (6,3%),
- Trissacarídeo: NeuAc α 2- 3 + Gal β 1-3 + GalNAc-O-R (18,4%),
- Trissacarídeo: Gal β 1-3 + NeuAc α 2-6 + GalNAc-O-R (18,5%),

- Tetrassacarídeo: NeuAc α 2-3 + Gal β 1-3 + NeuAc α 2-6 + GalNAc-O-R (56%).

Apesar da κ -caseína possuir 11 variantes genéticas, o CMP bovino apresenta apenas duas, como anteriormente comentado, A e B, as quais diferem na substituição de dois aminoácidos (FIGURA 2) (FARRELL Jr et al., 2004). Primeiro para a variante A na posição 136 ocorre a treonina (Thr), enquanto que para a variante B a isoleucina (Ile); segundo na posição 148 a variante A possui ácido aspártico (Asp), enquanto a variante B alanina (Ala). Os sítios fosforilados, de acordo com vários estudos, são: serina (Ser) 149 e 127. Já os sítios com grande potencial de glicosilação são: treonina (Thr) 121, 131, 133, 135, 136 (variante A), 142 e 165; e serina (Ser) 141 e 142 (KANAMORI et al., 1980; ZEVACO; RIBADEAU-DUMAS, 1984; TAKEUCHI et al., 1985; SAITO; YAMAJI; ITOH, 1991; PISANO et al., 1994).

101	Met	Ala	Ile	Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile	Pro	...

FIGURA 2 - ESTRUTURA PRIMÁRIA DO CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP) BOVINO PARA AS VARIANTES A E B
 FONTE: THOMA-WORRINGER, SORENSEN, LÓPEZ-FANDIÑO (2006).

CMP é encontrado no soro de leite entre 1,2 a 1,5 g.L⁻¹ (MANSO; LOPEZ-FANDINO, 2004). O interesse tecnológico na utilização desse peptídeo em alimentos vem crescendo, uma vez que sua composição em aminoácidos é bastante rica, pois fornece 7 dos 10 aminoácidos essenciais (Tabela 1) (CHU; MACLEOD; OZIMEK, 1996), sendo uma das poucas proteínas naturais que não possui fenilalanina (Phe) em sua composição (NAKANO et al., 2002). Entretanto, a amostra comercial utilizada neste trabalho não é isenta desse aminoácido, apresentando-se com baixa concentração 0,5 g / 100 g.

Estudos recentes realizados por Lim et al. (2007) demonstraram que as propriedades tecnológicas desse peptídeo permitem sua utilização em

alimentos semi-sólidos, como pudim e bebidas, obtendo boa aceitação sensorial. Possui boa capacidade emulsificante em toda a região de pH alcalino, o que acaba sendo vantajoso em alimentos com grande faixa de variação de pH durante o processamento (CHOBERT et al., 1989; MARTÍN-DIANA; FRÍAS; FONTECHA, 2005). Em concentração de 12,5% em pH 7,0 e aquecimento de 80 °C tem capacidade de formar gel, mas quando adicionado a géis de proteínas de soro de leite há uma redução na força e capacidade de retenção de água, devido ao CMP não incorporar-se à rede do gel e então competir pela água ligada (AHMED; RAMASWAMY, 2003; VEITH; REYNOLDS, 2004).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO TEÓRICA DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NO CMP

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA	VALOR TEÓRICO* (%)
Ácido aspártico	Asp	8,5
Triptofano	Trp	0
Treonina	Thr	18,2
Serina	Ser	7,8
Ácido glutâmico	Glu	19,2
Glicina	Gly	0,9
Alanina	Ala	5,3
Valina	Val	8,9
Metionina	Met	2,0
Isoleucina	Ile	10,1
Leucina	Leu	1,7
Tirosina	Tyr	0
Fenilalanina**	Phe	0
Histidina	His	0
Lisina	Lys	5,7
Arginina	Arg	0
Prolina	Pro	11,6

Fonte: CHU; MACLEOD e OZIMEK (1996).

NOTAS: *Valor teórico calculado conforme a estrutura primária do CMP.

**Material utilizado no presente trabalho apresenta 0,5 g de fenilalanina em 100 g de amostra.

1.2 CARBOXIMETILCELULOSE

Carboximetilcelulose (CMC) é um polímero linear aniônico (Figura 3) obtido a partir da celulose, a qual pode ser modificada quimicamente por esterificação das moléculas de glicose, a fim de obter uma macromolécula hidrossolúvel a temperatura ambiente. Soluções desse polissacarídeo mantêm

a viscosidade normal na faixa de pH entre 4 e 10 (HIRATA; SOUZA; PESSOA, 1993). Em geral, uma solução diluída de CMC apresenta pH próximo à neutralidade, sendo que a maioria de seus grupos carboxílicos-ácidos encontra-se na forma de sal de sódio e uma pequena quantidade na forma de ácidos livres. Seu pK encontra-se na faixa de 4,2 a 4,4 (KELLER, 1983).

Suas propriedades e aplicações dependem, essencialmente, da viscosidade de suas soluções, que por sua vez é dependente do GS (grau de substituição), definido como o número médio de grupos hidroxila substituído por unidade D-glicopiranosil da cadeia polimérica, como também da distribuição dos grupos carboximetila. CMC grau alimentício possui GS entre 0,4 -0,7, uma vez que quanto maior o grau de substituição, mais hidrofílico é o poliânion e quanto mais uniforme é essa substituição mais compatível o polissacarídeo se torna na presença de sais dissolvidos e adquire uma menor tendência à tixotropia em comparação com uma distribuição desigual (FEDDERSEN; THORP, 1993).

É compatível com vários ingredientes alimentícios, com outros tipos de hidrocolóides, açúcares e também proteínas (KELLER, 1983). A interação com proteínas pode auxiliar na solubilidade proteica e estabilizar a solução dependendo das condições de pH, força iônica e relação estequiométrica (FEDDERSEN; THORP, 1993). Essa interação pode ser observada através do aumento da viscosidade do sistema e também de outras medidas físicas, sendo de natureza iônica, mas podem ocorrer também ligações de hidrogênio e interações do tipo Van der Waals. Esse recurso é utilizado para conferir ao sistema uma melhora das propriedades funcionais das proteínas (GANZ, 1977; GLICKSMAN, 1982; KELLER, 1983; TOLSTOGUZOV, 1998).

A CMC pode formar complexos solúveis ou insolúveis (coacervados) com proteínas. A interação entre proteínas do leite e CMC resulta em máxima viscosidade em leites aromatizados em pH entre 4 e 5, devido à atração eletrostática entre os grupos com cargas opostas da proteína e da cadeia do polissacarídeo. Já a formação de complexos insolúveis ocorre em pH próximo a 3,5 ou abaixo, dependente do GS, pH e força iônica do sistema (KELLER, 1983). Sistemas coacervados ocorrem quando o meio se encontra com valores de pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas (pI) e acima da constante de ionização das gomas (pK). Nesse caso, proteínas e hidrocolóides estão unidos

por interações eletrostáticas e permanecem na mesma fase (TOLSTOGUZOV, 1997; SCHMITT et al., 1998).

A compatibilidade termodinâmica dos polissacarídeos com as proteínas respeita a seguinte ordem decrescente: Pectina> CMC> Alginatos> Goma Arábica> Dextrina (TOLSTOGUZOV, 1986). Assim como pectinas e alginatos, a CMC tem capacidade de manter proteínas dispersas mesmo em condições onde ocorreria precipitação, a exemplo disso temos a caseína e proteína da soja (IMESON; LEDWARD; MITCHELL, 1977; SANDERSON, 1981; HIRATA; SOUZA; PESSOA, 1993). Tem uma extensa interação com proteínas do soro de leite, devido ao seu caráter aniônico em pH entre o pI da proteína e o pK do polissacarídeo (TOLSTOGUZOV, 1997).

Em alimentos, a CMC pode ser utilizada em molhos para salada e outras emulsões, como colóide protetor, capaz de aumentar a estabilidade do sistema (SIMÃO, 1985). Durante a estocagem por longos períodos, pode ocorrer queda de viscosidade em consequência de ataque bacteriológico; para evitar tal acontecimento recomenda-se o uso de conservadores. Segundo a FDA, um dos conservadores recomendados para carboximetilcelulose grau alimentício é o ácido sórbico e seus sais (HIRATA; SOUZA; PESSOA, 1993; MULTON, 2000).

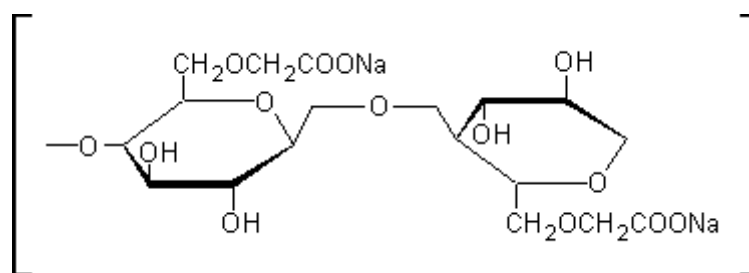


FIGURA 3 - ESTRUTURA IDEALIZADA DA CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA COM GS:1,0

1.3 INTERAÇÕES PROTEÍNA-POLISSACARÍDEO

Misturas de biopolímeros exibem comportamentos mais complexos do que misturas de polímeros sintéticos, devido aos primeiros relacionarem o equilíbrio ao estado de ordem - desordem de conformação, além de apresentarem transição e separação de fases em determinadas situações.

Sistemas contendo proteínas e polissacarídeos são comumente encontrados em alimentos, sendo sua interação interessante, pois melhoram algumas propriedades funcionais das proteínas nesses sistemas (CÈSARO et al., 1999).

Interações entre polímeros resultam em incompatibilidade e formações complexas, sendo exceção a miscibilidade entre os componentes. O comportamento de uma solução com dois biopolímeros é controlado pelo balanço entre os efeitos entálpicos e a entropia do sistema (SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998). Na presença de polissacarídeos, a temperatura de desnaturação de algumas proteínas é alterada ou a capacidade de formação dos géis é modificada. Em solução, pode ocorrer atração ou repulsão entre proteínas e polissacarídeos, devido a fatores como origem, pH, força iônica, temperatura, concentração ou cisalhamento a que são submetidos (DELBEN; STEFANCICH, 1997). Em um sistema ternário, pode-se distinguir três possíveis situações de equilíbrio (Figura 4):

1. Incompatibilidade: ocorre a segregação dos biopolímeros, ou seja, há uma repulsão mútua. Formam-se duas fases aquosas, imiscíveis, e cada biopolímero fica em uma dessas fases.
2. Co-solubilidade: ocorre para muitas soluções diluídas onde o sistema é estável. Com o aumento da concentração dos biopolímeros pode tornar-se instável, dependendo do tipo de interação. Como regra, misturas biopoliméricas tendem a segregação.
3. Complexação ou Coacervação: há uma forte atração entre as moléculas dos dois biopolímeros resultando em formações complexas. São formadas duas fases aquosas distintas, sendo que uma das fases contém os dois polímeros (TOLSTOGUZOV, 1991; GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; POLYAKOV; GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998).

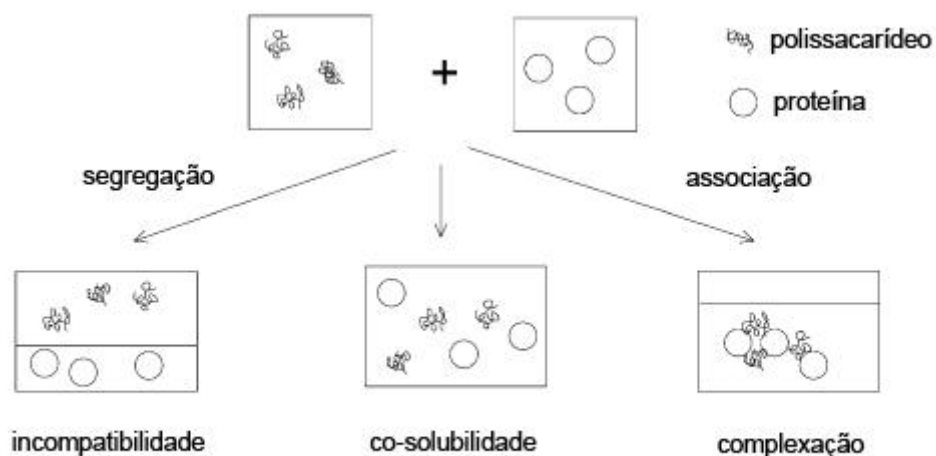


FIGURA 4 - PRINCIPAIS TENDÊNCIAS NO COMPORTAMENTO DE MISTURAS DE PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS
 FONTE: KRUIF; TUINIER (2001).

1.4 SISTEMAS COLOIDAIS

Colóides são sistemas nos quais um ou mais componentes apresentam pelo menos uma de suas dimensões dentro do intervalo de 1 nm (10^{-9} mm) a $1\mu\text{m}$ (10^{-6} mm), ou seja, abrange tanto moléculas grandes como pequenas partículas. O termo “micro heterogêneo” constitui uma descrição apropriada para a maior parte dos sistemas coloidais. Não existe, contudo, uma separação nítida entre sistemas coloidais e sistemas não-coloidais, mesmo nas proximidades do limite superior das dimensões do estado coloidal. O tamanho das gotas presentes em emulsões é superior a $1\mu\text{m}$, contudo é conveniente tratar as emulsões como sistemas coloidais (SHAW, 1975).

Shaw (1975) sugeriu classificar os sistemas coloidais em três grupos: dispersões coloidais, soluções verdadeiras e colóides de associação. Para Melik e Fogler (1988), os dois últimos são termodinamicamente estáveis e constituem sistemas reversíveis à floculação, enquanto o primeiro sistema é instável termodinamicamente e irreversível após a separação das fases.

Nos alimentos, os colóides formam os mais importantes sistemas reguladores do conteúdo e tipo de água presente (BOBBIO; BOBBIO, 1992). As dispersões coloidais mais frequentes em alimentos estão descritas no Quadro 1.

QUADRO 1 - TIPOS DE DISPERSÕES COLOIDAIIS EM ALIMENTOS

FASE DISPERSA F_1	FASE CONTÍNUA F_2	F_1/F_2	CLASSIFICAÇÃO	EXEMPLOS
Sólido	Líquido	S/L	Sol	Solução de pectina
Líquido	Líquido	L/L	Emulsão	Maionese
Gás	Líquido	G/L	Espuma	Clara de ovo batida
Gás	Sólido	G/S	Espuma sólida	Sorvete
Líquido	Sólido	L/S	Gel	Gelatina, geléias, queijo

FONTE: BOBBIO, BOBBIO (1992).

1.4.1 Sol

Sol é uma dispersão de partículas coloidais, monômeros, que se encontram estáveis em um fluido. No caso específico do meio dispersante ser água, denomina-se hidrossol, como exemplo têm-se dispersões contendo proteína ou gomas em água (SILVA; RAO, 1999).

Em alimentos a transição do estado sol para gel é muito importante, a exemplo disso tem-se agregação das proteínas presentes na clara durante o cozimento do ovo e da caseína na formação do queijo, entre outros (CLARK; ROSS-MURPHY, 1987).

A transição sol-gel, também chamada de gelificação, começa com a agregação de monômeros, formando constituintes maiores até que estes se estendam por todo o sol (ROOS, 1995). Esta transição pode ser melhor visualizada acompanhando as transformações na Figura 5. Inicialmente o sistema é constituído por partículas coloidais dispersas (sol) (a). Estas partículas se ligam formando pequenas cadeias ramificadas tridimensionais (b) e regiões de microgel, onde o índice de refração e a densidade são próximos aos da dispersão, portanto não decantam (c). O sistema passa apresentar comportamento elástico quando o crescimento dessas regiões estruturadas abrange a metade do volume total, portanto, a viscosidade tende ao infinito e o sol alcança o ponto de gel (d). As regiões estruturadas crescem conjuntamente, culminando na formação de uma rede que ocupa todo o volume do sistema (e-f) (ILER, 1979).

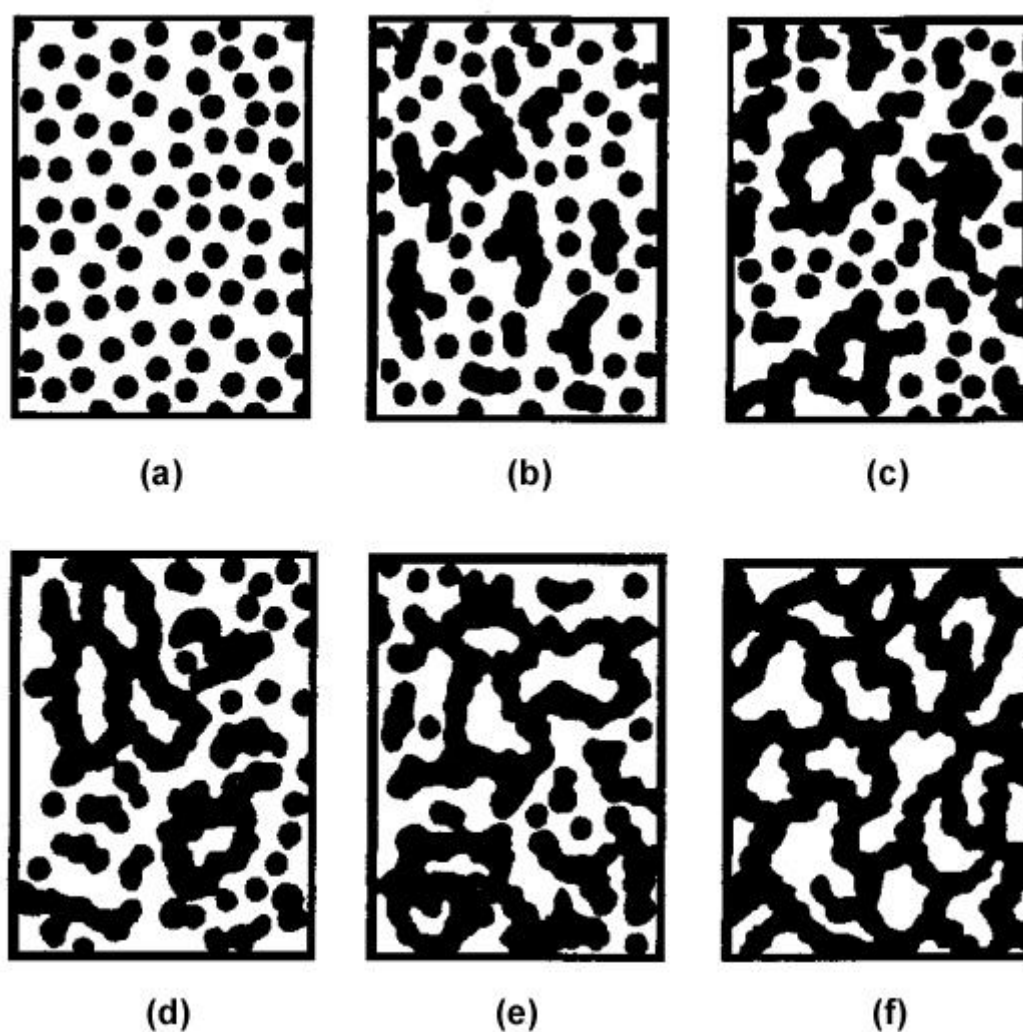


FIGURA 5 – ESQUEMA DE AGREGAÇÃO DOS MONÔMEROS DURANTE A TRANSIÇÃO SOL-GEL

FONTE: ILER (1979)

1.4.2 Gel

Há muitas definições para o processo de gelificação. Em geral, compreende a transição de sol ou solução de alta massa molar para gel, ou sistema coloidal, perdendo sua habilidade de fluxo, como uma consequência das interações entre as partículas sol (SWIDERSKI; WASZKIEWICZ-ROBAK, 1999). Assim, como resultado da associação dessas cadeias poliméricas, uma rede 3D é formada e esta imobiliza internamente a fase líquida. Em muitos alimentos, a rede de gel consiste em polissacarídeos e/ou proteínas. Tal rede pode conter também fibras, construída por polímeros unidos por ligações de

hidrogênio, forças de Van der Waals, pontes iônicas, forças covalentes ou o próprio emaranhado das cadeias. A fase líquida de um gel consiste em água ou solução aquosa de componentes de baixa massa molar ou de cadeias poliméricas curtas. Géis com polissacarídeos, em alguns casos, podem conter 1% do polímero e reter até mesmo 99% de água (WHISTLER; BEMILLER, 1977).

O mecanismo de gelificação dos hidrocolóides é explicado em termos de interações polímero - polímero, polímero - solvente, polímero-íons (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}). Na maioria dos casos, essas interações dependem da formação de cadeias de polímeros dupla hélice em espiral na solução. A gelificação pode ser influenciada por fatores térmicos (por exemplo, agar), químicos (por exemplo, alginatos) ou termo-químicos (por exemplo, carragenas, pectinas de alta metoxilação) (GLICKSMAN, 1982).

Na formação de uma rede proteica há agregação das moléculas de proteína por desnaturação prévia dessas e/ou acidificação do sistema. Algumas propriedades como textura e sinerese nesses géis modificam-se não somente por adição de polissacarídeos, mas também pelas variações na força iônica e pH do sistema (RENKEMA et al., 2000).

A sinerese pode resultar da difusão passiva de água, como também de forças externas e variações de temperatura. Essa perda de água pode redundar no encolhimento dos géis e modificações na textura. Em geral, géis quebradiços são mais susceptíveis à sinerese do que géis elásticos (MAO; TANG; SWANSON, 2001).

Com o intuito de melhorar as propriedades tecnológicas dos géis, é comum a utilização de sistemas mistos contendo proteínas e polissacarídeos, uma vez que hidrocolóides não amiláceos melhoram as propriedades reológicas e de textura dos alimentos, aumentam a retenção de água e a viscosidade, diminuem a sinerese e mantêm a qualidade tecnológica dos produtos durante o armazenamento (FUNAMI et al., 2005).

1.5 REOLOGIA

A reologia é o estudo da deformação e escoamento da matéria; abrange desde a mecânica de fluidos até a elasticidade de Hooke (STEFFE, 1996; RAO, 1999; BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004). A deformação ocorre no caso da matéria estar no estado sólido e o escoamento quando a matéria encontra-se no estado líquido. A propriedade reológica de interesse no caso dos sólidos é a elasticidade e no caso dos líquidos, viscosidade. No entanto, alguns materiais não podem ser diferenciados em sólidos ou líquidos com clareza, de modo que a propriedade reológica de interesse nesses casos é a viscoelasticidade (SHAW, 1975; PASQUEL, 1999; RAO, 1999).

A viscosidade é parte das propriedades reológicas dos alimentos, que abrange, além dos fluidos, os sólidos e semi-sólidos. Alimentos em geral podem ser classificados em sólidos, gel, líquidos homogêneos, suspensões líquidas e emulsões (RAO, 1999). Alimentos na forma líquida usados em processos na indústria ou pelo consumidor incluem pastas, purês, refrigerantes, ovos e seus produtos, leite e seus derivados, sucos de frutas naturais, concentrados vegetais e molhos, entre outros (IBARZ; CÁNOVAS, 2002).

A viscosidade pode ser definida como a medida da fricção interna de um fluido, isto é, a resistência encontrada pelas moléculas em se moverem no interior de um líquido, devido ao movimento Browniano e às forças intermoleculares (GOULD, 1992). Essa fricção torna-se aparente quando uma camada de fluido move-se em relação à outra camada. Assim, à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessária mais energia para que ocorra o “cisalhamento”, que acontece sempre quando o fluido é fisicamente movido ou distribuído, como no escoamento, espalhamento, aspersão, mistura, entre outros. Fluidos altamente viscosos, então, exigem mais força para mover-se que materiais menos viscosos (LEWIS, 1993; BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, 1994; MOTT, 1996).

Isaac Newton foi o primeiro a expressar as leis básicas da mecânica clássica, descrevendo o comportamento de fluxo de um fluido ideal, conforme o modelo na Figura 6. Onde um par de placas paralelas com uma área “A” é

separado por uma distância “dx” e no espaço entre elas está um fluido, gás ou líquido. Essas placas são movidas na mesma direção em diferentes velocidades, “V1” e “V2” (BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, 1994; SCHRAMM, 2000; BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

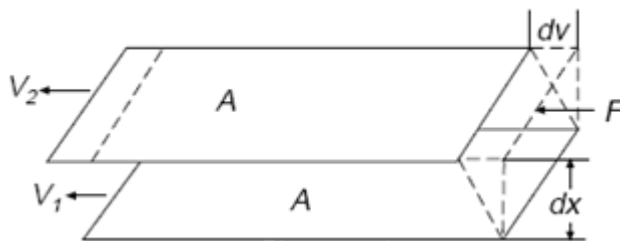


FIGURA 6 – MODELO DEFINIDO POR ISAAC NEWTON

FONTES: BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES (1994)

A força constante “F” necessária para manter a diferença na velocidade é proporcional ao gradiente de velocidade, de acordo com a equação 1, onde η é uma constante de proporcionalidade para um determinado material, definida como “viscosidade”. O gradiente de velocidade dv/dx é uma medida de mudança na velocidade onde as camadas intermediárias movem-se uma em relação às outras. Isso descreve o cisalhamento do fluido e é chamado de “taxa de cisalhamento” ou “ $\dot{\gamma}$ ”, sua unidade de medida é “segundos recíprocos” (s^{-1}) (BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, 1994; BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004):

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dx} \quad (1)$$

O termo F/A indica a força por unidade de área requerida para produzir cisalhamento. Refere-se como “tensão de cisalhamento” ou “ τ ”, sua unidade de medida é Newtons por metro quadrado (N/m^2) (SCHRAMM, 2000).

Usando essas condições simplificadas, viscosidade pode ser definida matematicamente como descrita na equação 2:

$$\eta = \text{viscosidade} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{\text{tensão de cisalhamento}}{\text{taxa de cisalhamento}} \quad (2)$$

A viscosidade é uma propriedade inerente aos fluidos quimicamente puros e fisicamente homogêneos conhecidos como fluidos newtonianos. Nos fluidos não-newtonianos, não homogêneos nem puros (como grande parte dos alimentos), usa-se o termo viscosidade aparente “ η_{ap} ” (GOULD, 1992). As unidades internacionais para viscosidade são Pascal - segundos (Pa.s) ou miliPascal - segundos (mPa.s).

A Figura 7 mostra a classificação dos fluidos segundo o comportamento reológico, determinado por medidas da tensão de cisalhamento versus a taxa de cisalhamento, e a representação dos dados experimentais por diagramas viscométricos e equações empíricas, em função da temperatura e/ou concentração (SARAVACOS; MAROULIS, 2001).

O comportamento reológico de um fluido pode variar de Newtoniano a não-Newtoniano dependente do tempo, isso devido à sua origem, composição, comportamento estrutural e descrições anteriores (RAO; RIZVI, 1986). Durante a produção, estocagem, transporte, exposição e consumo, os alimentos sofrem contínuas variações de temperatura; por essa razão é importante saber as propriedades reológicas dos produtos em função da temperatura. Em fluidos não-Newtonianos, a viscosidade aparente é expressa por uma taxa de cisalhamento fixa versus a viscosidade (IBARZ; CÁNOVAS, 2002).

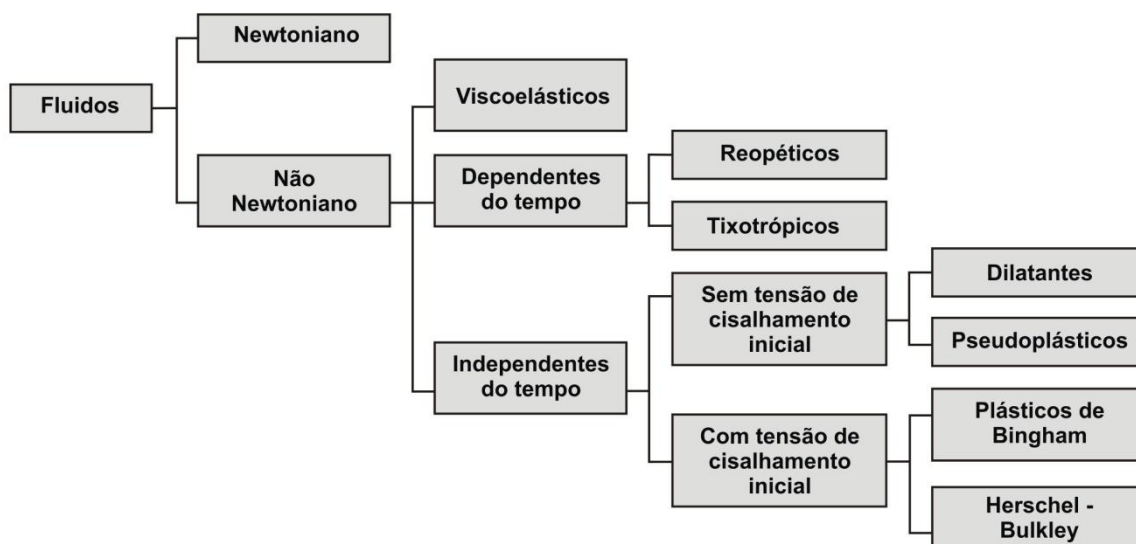


FIGURA 7 – ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DOS FLUIDOS SEGUNDO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

FONTE: STEFFE (1996)

As proteínas têm papel complexo na reologia de géis e emulsões, sendo as análises reológicas fundamentais para obter informações sobre dependência do tempo, comportamento viscoelástico e mecanismos moleculares que cercam mudanças na estrutura quando da gelificação das proteínas (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). Na indústria de alimentos, os dados reológicos são de grande importância para (MASKAN; GOGUS, 2000):

- Realizar cálculos de engenharia de processos, englobando uma grande quantidade de equipamento, como agitadores, extrusoras, bombas, trocadores de calor, tubulações e homogeneizadores;
- Determinar a funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos;
- Controlar a qualidade do produto final ou intermediário; e
- Avaliar a textura pela correlação com dados sensoriais.

1.5.1 Fluidos Newtonianos

Líquidos simples em alimentos, como soluções aquosas de açúcar, sucos clarificados, óleos vegetais, chá, café, cerveja, vinhos e refrigerantes são fluidos Newtonianos, onde a tensão de cisalhamento (τ) é linearmente proporcional à taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) (Figura 8A), ou seja, a viscosidade (η) mantém-se constante com a variação na taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) (Figura 8B), influenciada somente pela temperatura e composição (RAO; RIZVI, 1986; SARAVACOS; MAROULIS, 2001).

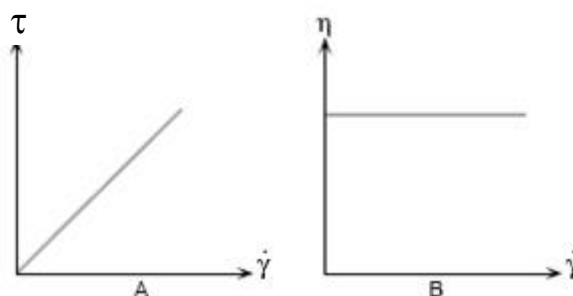


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE FLUIDOS NEWTONIANOS

FONTE: BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES (1994)

Incorporando moléculas e micelas de polímeros, partículas sólidas, gotas e bolhas de gás em fluidos newtonianos alteram-se a reologia desses, ocasionando uma relação não linear entre tensão e taxa de cisalhamento (IBARZ; CÁNOVAS, 2002).

1.5.2 Fluidos não-Newtonianos

Quando as interações entre os componentes de um fluido afetam a velocidade de deformação causada por forças externas, resultando na não proporcionalidade entre a taxa ($\dot{\gamma}$) e a tensão de cisalhamento (τ), então o fluido é chamado não-Newtoniano (BOBBIO, 1995; IBARZ; CÁNOVAS, 2002).

Os fluidos não-Newtonianos podem ser independentes ou dependentes do tempo. A Figura 9 mostra as curvas de fluxo típicas de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos independentes do tempo. Para estes últimos, à temperatura e composição fixas, a viscosidade não é uma constante, sendo

denominada viscosidade aparente (η_{ap}), a qual depende da relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, conforme equação 3 (RAO; RIZVI, 1986).

$$\eta_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (3)$$

onde:

η_{ap} = viscosidade aparente (Pa.s);

τ = tensão de cisalhamento ($\text{N/m}^2 = \text{Pa}$);

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (s^{-1}).

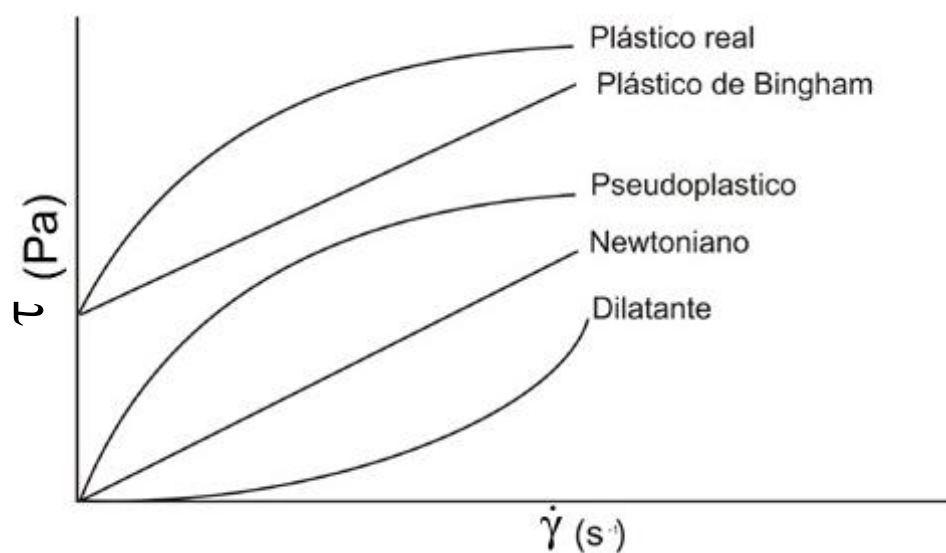


FIGURA 9 – CURVAS DE FLUXO PARA FLUIDOS NEWTONIANOS E NÃO – NEWTONIANOS INDEPENDENTES DO TEMPO

FONTE: Modificado de URBICAIN; LOZANO (1997).

1.5.2.1 Fluidos não-Newtonianos independentes do tempo

Plásticos de Bingham são fluidos caracterizados pela existência de uma tensão de cisalhamento inicial (τ_0), diferente de zero, antes de o fluido sofrer uma deformação ou escoamento. Tal material deformará elasticamente, ou seja, o fluido de Bingham se comporta como um corpo sólido ou permanece em repouso, quando a tensão externa aplicada é menor que a tensão de cisalhamento inicial. Quando a tensão externa exceder o valor de τ_0 , a curva da tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) do fluido pode ser linear ou não linear, mas não passará pela origem do gráfico. Para níveis de cisalhamento maiores que τ_0 , a substância comporta-se como um material viscoso (URBICAIN; LOZANO, 1997; BARNES, 1999; McCLEMENTS, 2006).

Um fluido, cujo gráfico de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) é uma curva linear, onde $|\tau| > |\tau_0|$, é chamado fluido plástico de Bingham, sendo caracterizado por uma constante de viscosidade plástica (tangente do gráfico) e pela τ_0 . Por outro lado, materiais que possuem τ_0 e uma curva não-linear no gráfico de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) em coordenadas lineares para $|\tau| > |\tau_0|$ são chamados pseudoplásticos com tensão inicial (Herschel-Bulkley ou plástico real) (BARNES, 1999). Purê de batata, mostarda e catchup são alguns exemplos de fluidos de Bingham (BOURNE, 1982).

Muitos fluidos apresentam uma queda drástica na viscosidade quando é aumentada a taxa de deformação; para esses fluidos, o gráfico resultante da tensão (τ) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) não é uma linha reta, mas sim convexa, devido à velocidade de deformação aumentar em proporções maiores que a tensão tangencial, para cada valor de τ há um valor de $\dot{\gamma}$ correspondente. Fluidos que se diluem com o aumento da taxa de cisalhamento denominam-se pseudoplásticos; emulsões, suspensões ou dispersões de alta importância técnica e comercial pertencem a esse grupo (HOLDSWORTH, 1971; MULLER, 1978; SHARMA; MULVANEY; RIZVI, 2000).

Fluidos pseudoplásticos quando em repouso apresentam um estado desordenado, mas quando submetidos a uma tensão de cisalhamento suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada, quanto maior a

tensão aplicada, maior será a ordenação, conseqüentemente, a viscosidade aparente será menor (HOLDSWORTH, 1971).

Para fluidos dilatantes ocorre o aumento da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento. Esses fluidos se comportam como um líquido (escoam) a baixas tensões de cisalhamento, mas podem se tornar tão rígidos (não escoam) quanto um sólido quando submetidos a tensões de cisalhamento elevadas. Esse efeito é observado em pastas de partículas defloculadas densamente empacotadas. Quando a taxa de cisalhamento aumenta, esse empacotamento deve ser quebrado para permitir que as partículas se movam umas em relação às outras. A expansão resultante faz com que o líquido seja insuficiente para preencher os vazios criados. A essa expansão se opõem forças de tensão superficial do líquido “aprisionado” entre as partículas (GLICKSMAN, 1982). Em alguns casos, é possível observar a presença de uma tensão de cisalhamento inicial (τ_0), a partir da qual o fluido começa a escoar, apresentando comportamento análogo ao dos fluidos dilatantes. Alguns tipos de mel e suspensões de amido apresentam comportamento dilatante (STEFFE, 1996; SHARMA; MULVANEY; RIZVI, 2000).

1.5.2.2 Fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo

Muitos fluidos não-Newtonianos em alimentos possuem estrutura complexa e exibem comportamento reológico dependente do tempo; a viscosidade aparente desses fluidos a uma determinada taxa de cisalhamento muda significativamente com o tempo, como pode ser observado na Figura 10. Os fluidos dependentes do tempo mais comuns são os tixotrópicos para os quais a viscosidade aparente diminui com o tempo de cisalhamento. Os fluidos reopéticos exibem o comportamento oposto, a viscosidade aparente aumenta com o tempo de cisalhamento (SARAVACOS; MAROULIS, 2001). Esse tipo de comportamento não é comum em alimentos, mas pode ocorrer em soluções de amido altamente concentradas (SHARMA; MULVANEY; RIZVI, 2000).

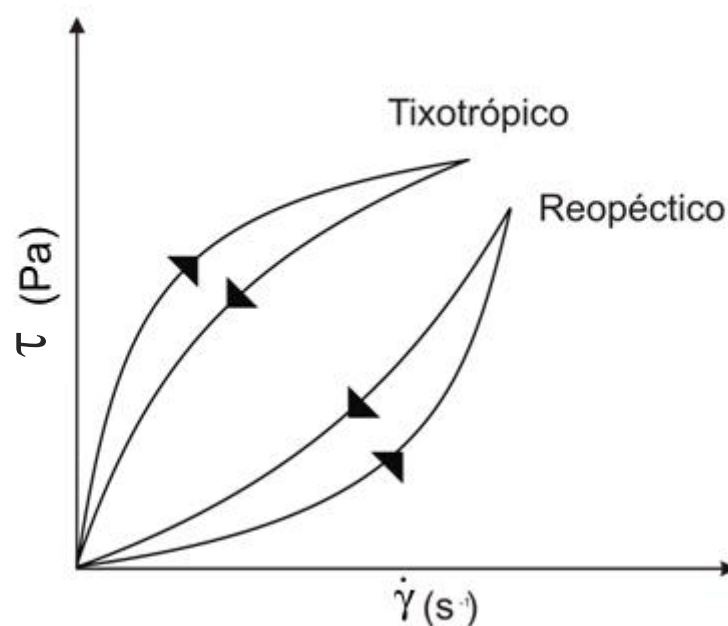


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE FLUIDOS NÃO-NEWTONIANOS DEPENDENTES DO TEMPO

FONTE: Modificado de SHARMA, MULVANEY e RIZVI (2000).

1.5.2.3 Fluidos viscoelásticos

Os alimentos em sua totalidade apresentam curvas de fluxo singulares que fornecem informações de extrema importância na indústria de alimentos. Esses dados obtidos em condições estacionárias possibilitam a caracterização reológica e a definição do comportamento desses fluidos. A viscosidade é uma propriedade inerente a todos os fluidos sem exceção, mesmo quando esses exibem ou não comportamento elástico; no entanto, muitos fenômenos não podem ser descritos meramente em função da viscosidade e o seu comportamento elástico deve ser considerado (SHARMA; MULVANEY; RIZVI, 2000).

Em soluções de biopolímeros ocorre viscoelasticidade, desse modo o comportamento é intermediário entre um sólido perfeitamente elástico e um líquido puramente viscoso (SILVA; RAO, 1992). McClements (2006) ressalta que alguns alimentos não são líquidos puros ou sólidos puros, mas possuem

propriedades reológicas parcialmente viscosas e parcialmente elásticas, como exemplos citam-se creme de amendoim e manteiga (DICKIE; KOKINI, 1982).

Em testes oscilatórios, as amostras são submetidas a deformações e tensões que variam harmonicamente e fornecem resultados sensíveis para a composição química e estrutura física. Sendo muito úteis em uma variedade de aplicações, incluindo a avaliação da força de géis, gelatinização de amido, estudo do fenômeno da transição vítrea, observação da coagulação ou desnaturação de proteínas, avaliação de coágulo em produtos lácteos, derretimento de queijos, desenvolvimento de textura em produtos de panificação e produtos cárneos, testes de vida útil e a correlação das propriedades reológicas com a percepção sensorial humana (STEFFE, 1996). Além de permitir a caracterização da conformação macromolecular e interações intermoleculares em solução (SILVA; RAO, 1992).

Se por conjectura o material está sujeito à deformação cisalhante oscilatória de forma senoidal, desde que no regime viscoelástico linear, as propriedades viscoelásticas podem ser obtidas por parâmetros como G' (módulo elástico ou de armazenagem) e G'' (módulo viscoso ou de dissipação), sendo a soma desses correspondente a G^* (módulo de cisalhamento complexo) (equação 4).

$$G^* = G' + G'' \quad (4)$$

G^* por sua vez representa a resistência total de uma substância contra uma deformação aplicada, conforme equação 5.

$$G^* = \frac{\tau^\circ}{\gamma^\circ} \quad (5)$$

onde:

τ° = tensão total

γ° = deformação do sistema

De forma geométrica os componentes do módulo complexo (G^*) são obtidos conforme Figura 11.

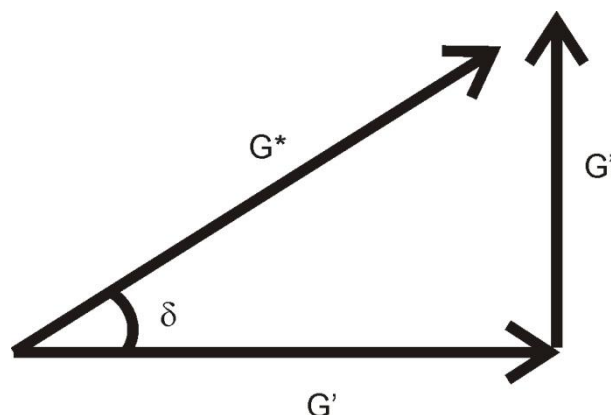


FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS MÓDULOS COMPLEXO, ELÁSTICO E VISCOSO

De acordo com Schramm (2006), o termo módulo de armazenamento G' indica que a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste, porém pode ser recuperada mais tarde. Já o termo módulo de dissipação G'' faz alusão ao fato de a energia usada para iniciar o fluxo ser perdida de forma definitiva, sendo transformada em calor de cisalhamento. Se um fluido é puramente viscoso, o ângulo de fase δ é de 90° (equações 6 e 7).

$$G = 0 \text{ e } G'' = G^* \quad (6)$$

Se um sólido é puramente elástico, então o ângulo de fase δ é igual a 0° :

$$G' = G^* \text{ e } G'' = 0 \quad (7)$$

O ângulo de fase pode ser obtido de acordo com a relação descrita na equação 8.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (8)$$

1.5.3 Modelos reológicos

A descrição do comportamento reológico não-Newtoniano é realizada utilizando modelos empíricos capazes de relacionar os dados de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento. É indispensável ao controle de qualidade, controle intermediário em linhas de produção e ao projeto no dimensionamento de equipamentos e processos. Dependendo do modelo utilizado, possuem ou não tensão inicial (RAO; RIZVI, 1986).

Os modelos mais utilizados para descrever o comportamento não-Newtoniano são: Ostwald-de-Waele (Lei da Potência), Herschel-Bulkley, Bingham, Casson e Mizrahi-Berk. O Quadro 2 mostra as equações (9 -14) constitutivas para alguns modelos reológicos normalmente utilizados e os valores dos parâmetros τ_0 , k e n para esses fluidos.

QUADRO 2 - EQUAÇÃO CONSTITUTIVA PARA ALGUNS MODELOS REOLÓGICOS E OS VALORES DE τ_0 , k E n PARA ESSES FLUIDOS

Modelo	Equação	τ_0	k	n
Plástico real – Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n$ (9)	> 0	> 0	$0 < n < \infty$
Newton	$\tau = k \cdot \dot{\gamma}$ (10)	0	> 0	1
Pseudoplástico – Ostwald-de-Waele	$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$ (11)	0	> 0	$0 < n < 1$
Dilatante – Ostwald-de-Waele	$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$ (12)	0	> 0	$1 < n < \infty$
Plástico de Bingham	$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}$ (13)	> 0	> 0	1
Casson	$\tau^{0,5} = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^{0,5}$ (14)	> 0	> 0	0,5

FONTE: Modificado de STEFFE (1996).

A escolha do modelo mais adequado deve basear-se nos parâmetros estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), Qui-quadrado (X^2), soma dos quadrados dos resíduos (SQR) e coeficiente de correlação (R). O melhor ajuste é analisado com base nos parâmetros R^2 (mede a proporção da variação total da média explicada pela regressão), definido como razão entre a soma quadrática total, e pelo Qui-quadrado (X^2) que expressa a diferença entre valores obtidos experimentalmente. Quanto maior for o valor de X^2 , maior será a discrepância entre as frequências observadas e esperadas. Quanto menor o valor de (R^2), maior a distância dos pontos experimentais ao modelo ajustado. Portanto, o modelo que melhor se ajusta é aquele com altos valores de R^2 (máximo=1) e baixos valores de X^2 (mínimo=0) (MONTGOMERY; RUNGER, 2003).

REFERÊNCIAS

- AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1535-1540. 2003
- BARNES, H. A. The yield stress – a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 81, p.133-178, 1999.
- BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Fenômenos de Transporte**. 2. ed. Parte I - Transporte de Momento. Rio de Janeiro: LTC, 2004, p. 11-254.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992.
- BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995.
- BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. New York: Academic Press, 1982, p. 325.
- BRODY, E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 39-46, 2000.
- BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES. **More Solutions to Sticky Problems**, 1994.
- CÈSARO, A.; CUPPO, F.; FABRI, D.; SUSSICH, F. Thermodynamic Behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, v. 388, p. 143-153, 1999.
- CHOBERT, J. M.; TOUATI, A.; BERTRANDHARB, C.; DALGALARRONDO, M.; NICOLAS, M. G. Solubility and emulsifying properties of k-casein and its caseinomacropeptide. **Journal of Food Biochemistry**, v. 13, p. 457-473, 1989.
- CHU L, MACLEOD A, OZIMEK L. Isolation of glycomacropeptide from sodium caseinate hydrolysate solution by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 303-306, 1996.
- CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: Clark A. H., Kamide K., Ross-Murphy S. B., Saito M., (authors). **Advances in polymer science**. New York: Springer-Verlag. 1987. p. 57-192.
- COOLBEAR, K. P., ELGAR, D. F., AYERS, J. S. Profiling of genetic variants of bovine k-casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 1055-1068, 1996.

DELBEN, F.; STEFANCICH, S. Interaction of Food Proteins with Polysaccharides I: properties upon Mixing. **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 325-346, 1997.

DICKIE, A. M.; KOKINI, J. L. Use of the Bird-Leider equation in food rheology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 5, p. 157-184, 1982.

DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 1017-1044, 1996.

FARRELL Jr., H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk- Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FEDDERSEN, R. L.; THORP, S. N. Sodium carboxymethylcellulose. In: **Industrial Gums**. Whistler, R. L., BeMiller, J. N. (Eds.), Academic Press, San Diego, 1993, p. 537-578.

FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; OMOTO, T.; GOTO, Y.; ASAI, I.; NISHINARI, K. Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behavior of starch. 2a. Functions of guar gums with different molecular weights on the gelatinization behavior of corn starch. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n.1, p. 15-24, 2005.

GANZ, A. J. Cellulose hydrocolloids. In: **Food colloids**. Graham H.G. (Ed.), AVI, Westport, CT, USA, 1977.

GLICKSMAN, M. Functional properties of hydrocolloids. In: **Food Hydrocolloids**. v. 1, M. Glicksman (Ed), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1982, p. 47-99.

GOULD, W.A. **Tomato production: processing & technology**. 3.ed. CTI publications, 1992.

GRINBERG, V. Ya; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 145, 1997.

HIRATA, R.; SOUZA, W.J.; PESSOA, L. Carboximetilcelulose na indústria alimentícia uma abordagem técnica. In: **Anais do simpósio sobre hidrocolóides**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 1993.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v. 2, p. 393-418, 1971.

IBARZ, A.; CÁNOVAS, G. V. B. **Food preservation technology series**: Unit operations in food engineering. Ed: CRC Press Inc, v. 2, p. 89-139, 2002.

ILER, R. K. The Chemistry of Sol-Gel Science. New York: Wiley, 1979.

IMESON, A. P.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. **Journal Science Food Agriculture**, v. 28, p. 661-668, 1977.

KANAMORI, M.; KAWAGUCHI, N.; IBUKI, F.; DOI, H. Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine k-casein from normal milk. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 1855–1861, 1980

KELLER, J. D. Sodium carboxymethylcellulose (CMC). **Food Hydrocolloids**. v. 3. Ed. M. Glicksman. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1983, p. 43-109.

KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 555-563, 2001.

LEONIL, J.; HENRY, G.; JOUANNEAU, D.; DELAGE, M. M.; FORGE, V.; PUTAUX, J. L. Kinetics of Fibril Formation of Bovine κ -Casein Indicate a Conformational Rearrangement as a Critical Step in the Process. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, p. 1267-1280, 2008.

LEWIS, M. J. **Propiedades físicas de los alimentos y los sistemas de procesado**. Zaragoza: Acribia, 1993.

LIM, K.; VAN CALCAR, S.; NELSON, K.; GLEASON, S. T.; NEY, D. M. Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 92, p. 831–840, 2007.

MANSO, M.A.; LOPEZ-FANDINO, R. k-Casein macropeptide from cheese whey: physiochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. **Food Reviews International**, v. 20, p. 339–355, 2004.

MAO, R.; TANG, J.; SWANSON, B. G. Water holding capacity and microstructure of gellan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 365-371, 2001.

MARTÍN-DIANA, A. B.; FRÍAS, J.; FONTECHA, J. Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 363-367, 2005.

MASKAN, M.; GOGUS, F. Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsion. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p. 173-177, 2000.

McCLEMENTS, J. **Food biopolimers and colloids research laboratory**. University of Massachusetts Amherst. 2006.
Disponível em: <http://www.people.umass.edu/mcclemen/581Rheology.html>
Acessado em: 10/04/2012.

MELIK, D. H.; FOGLER, S. Fundamentals of colloidal stability in quiescent media. In: **Encyclopedia of Emulsion Technology**, v.1, Becher, P. (Ed), London, 1988, p. 3-78.

MIKKELSEN, T. L., FRØKIER, H., TOPP, C., BONOMI, F., IAMETTI, F., PICARIELLO, G., FERRANTI, P., & BARKHOLT, V. Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4228–4238, 2005.

MOLLÉ, D.; LEONIL, J. Quantitative determination of bovine κ -caseinomacropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**, v. 15, p. 419-428, 2005.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. Calado, V. (Trad.), 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003, 461p.

MOTT, L. R. **Mecánica de fluidos aplicada**. México: Prentice-Hall Hispanoamericana S. A. 1996.

MULLER, H. G. **Introducción a la reología de los alimentos**. González, J. B. (Trad.) Zaragoza: Acribia, 1978, 174 p.

MULTON, J. L. **Aditivos y auxiliares de fabricación em las industrias agroalimentarias**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

NAKANO, T.; SILVA-HERNANDEZ, E. R. IKAWA, N. OZIMEK, L. Purification of κ -casein glycomacropeptide from sweet whey with undetectable level of phenylalanine. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 409-412, 2002.

PASQUEL, A. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v.33, p.86-97, 1999.

PHILLIPS, L. G. WHITEHEAD, D. M. KINSELLA, J. E. **Structure-function properties of food proteins**. Academic Press, San Diego, 1994.

PISANO, A.; PACKER, N. H.; REDMOND, J. W.; WILLIAMS, K. L.; GOOLY, A. Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine κ -casein. **Glycobiology**, v. 4, p. 4228-4238, 1994.

POLYAKOV, V. I.; GRINBERG, V. Ya; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 171, 1997.

RAO, M. A.; RIZVI, S. S. **Engineering properties of foods**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1986, 398p.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods**: principles and applications. New York: Aspen Publishers, 1999.

RENKEMA, J. M. S.; LAKEMON, C. M. M.; DE JONGH, H. H. J.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T.V. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 223-230, 2000.

ROOS, Y. H. Food Components and Polymers. In: **Phase Transitions in Foods**. San Diego: Academic Press. 1995, p. 109-156.

SAITO, T.; YAMAJI, A.; ITOH, T. A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2831-2837, 1991.

SAITO, T., ITOH, T. Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine k-casein A. **Journal of dairy science**, v. 75, p. 1768-1774, 1992.

SANDERSON, G. R. Polysaccharides in foods. **Food Technology**, v. 35, p. 50, 1981.

SARAVACOS, D. G.; MAROULIS, Z. B. **Transport properties of food**. New York: Marcel Dekker, Inc. 2001, p. 63-105.

SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. 2. edição, Karlsruhe, Alemanha, 2000.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. Mothé, C.; Correia, D. Z.; Petri, H. M.; Gonçalves, M.; Carestiato, T. (Eds). São Paulo: Artliber, 2006, 232p.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and techno functional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 38, p. 689-753, 1998.

SHARMA, S. K.; MULVANEY, S. J.; RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering: theory and laboratory experiments**. United States of America: Wiley-Interscience, 2000, 348p.

SHAW, J. D. **Introdução à química dos colóides e das superfícies**. Maar, J. H. (Ed). São Paulo, 1975.

SILVA, J. A.; RAO, M. A. Viscoelastic properties of food hydrocolloids dispersions. In: **Viscoelastic Properties of Foods**. Rao, M. A; Steffe, J. F. (Ed). London: Elsevier Applied Science, 1992, p. 207-231.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Rheological Behavior of Food Gel Systems. In: **Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications**. Rao, M. A. (Ed). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publication. 1999. p. 319-356.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985.

SYRBE, A.; BAUER, W.J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer Science Concepts in Dairy Systems – An Overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 179-193, 1998.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2. ed. Michigan: Freeman Press, 1996. 418p.

SWIDERSKI, F.; WASZKIEWICZ-ROBAK, B. Hydrokoloidy jako substancje kształtujące strukturę. Żywność wygodna i żywność funkcjonalna. WNT, Warszawa, p. 45-62 (in Polish), 1999.

TAKEUCHI, M.; TSUDA, E.; YOSHIKAWA, M.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Fractionation and characterisation of subcomponents of bovine κ -casein A. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 2269-2276, 1985.

THOMA-WORRINGER, C.; SORENSEN, J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1324–1333, 2006.

TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: **Functional Properties of Food Macromolecules**. Mitchell, J. R.; Ledward, D. A. (Eds.), Amsterdam/New York: Elsevier, 1986, p. 385-415.

TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, v. 4, p. 429-468, 1991.

TOLSTOGUZOV, V. B. Protein polysaccharide interactions. In: **Food proteins and Their Applications**. Damodaran, S.; Paraf, A (Eds.). New York: Marcel Dekker Inc., 1997, p. 171-198.

TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: **Functional Properties of Food Macromolecules**. Hill, S. E; Ledward, D. A.; Mitchell, J. R. (Eds), Gaithersburg/Maryland: Aspen Publishers Inc., 1998, p. 252-277.

URBICAIN, M. J.; LOZANO, J. E. Thermal and Rheological Properties of Foodstuffs. In: **Handbook of Food Engineering Practice**. Valentas, K. J.; Rotstein, E.; Singh, R. P. (Eds.), CRC Press Inc., Cap. 11, 1997. 732p.

VEITH, P. D.; REYNOLDS, E. C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 831-840, 2004.

WHISTLER, R. L; BEMILLER, J. N. **Carbohydrate chemistry for food scientists**. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, 1977, p.63–217.

ZEVACO, C.; RIBADEAU-DUMAS, B. A study on the carbohydrate binding sites of κ -casein using high performance liquid chromatography. **Milchwissenschaft**, v. 39, p. 206–210, 1984.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E DO pH NA INTERAÇÃO ENTRE CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE

RESUMO

Sistemas aquosos contendo caseinomacropeptídeo (CMP) na presença ou não de carboximetilcelulose (CMC) em diferentes concentrações e pHs (2, 4 e 6,5) foram investigados neste trabalho. Fortes evidências da interação entre o peptídeo e o polissacarídeo foram encontradas em todos os pHs, mesmo próximo à neutralidade. O polissacarídeo adiou a precipitação das amostras em pH 4, devido à formação de complexos solúveis, também foi observado a formação de coacervados. No entanto, pode ocorrer separação de fases em concentração maior que 8% de CMP. Em pH 2 acima de 2%, houve formação de gel. A técnica de FTIR com transformada de Fourier foi usada para analisar as mudanças nos sistemas. Os resultados demonstram alterações visíveis nas bandas em diferentes pHs e concentrações, na presença de CMC as bandas são mais intensas o que sugere uma interação associativa entre CMP-CMC, mas como a banda de amida I sofreu maiores modificações em razão do pH do que da presença de CMC, acredita-se que a interação entre CMC e CMP seja eletrostática. Em pH 6,5, essa interação é confirmada pelo aumento na viscosidade das amostras com CMC. O comportamento reológico também foi modificado passando de dilatante para pseudoplástico na presença do polissacarídeo.

Keywords: caseinomacropeptídeo, carboximetilcelulose, pH, concentração, interação.

2.1 INTRODUÇÃO

O caseinomacropeptídeo (CMP) é um peptídeo terminal composto por 64 aminoácidos resultantes da clivagem da κ -caseína na ligação Phe105-Met106 no processo fabril do queijo com o uso de quimosina. O CMP é liberado no soro, enquanto o restante da κ -caseína precipitada na massa (DELFOUR et al., 1965). Possui duas variantes genéticas A e B; e modificações translacionais, glicosilação e fosforilação. A forma glicosilada (gCMP) representa 50% do CMP total e contém a totalidade dos carboidratos presentes na κ -caseína, sendo o carboidrato predominante o ácido siálico (COOLBEAR, ELGAR & AYERS, 1996; MOLLÉ & LEONIL, 2005).

Suas propriedades funcionais o tornam um componente de grande interesse no desenvolvimento de novos produtos com apelo à saúde, como exemplo disso tem-se a possibilidade de utilização em alimentos destinados a portadores de fenilcetonúria, possui ainda efeito antitrombótico e imunomodulador (CHABANCE et al., 1995 e 1998; OTANI; MONNAI, 1995; OTANI et al., 1995; OTANI; HORIMOTO; MONNAI, 1996; MONNAI; OTANI, 1997; MATIN; OTANI, 2000). Além das propriedades funcionais, o CMP possui propriedades tecnológicas, como capacidade emulsificante e estabilização de emulsões, formação de gel e espuma, entre outras (BURTON; SKUDDER, 1987; CHOBERT et al., 1989; MARSHALL, 1991; AHMED; RAMASWAMY, 2003; MARTÍN-DIANA; FRÍAS; FONTECHA, 2005).

Sistemas contendo proteínas e polissacarídeos são muito utilizados na indústria de alimentos, uma vez que suas interações são interessantes, pois melhoram algumas propriedades tecnológicas das proteínas nesses sistemas. Em solução, pode ocorrer atração ou repulsão entre proteínas e polissacarídeos, devido a fatores como origem, pH, força iônica, temperatura, concentração ou cisalhamento a que são submetidos (DICKINSON, 1992; DELBEN; STEFANCICH, 1997; CÈSARO et al., 1999). Com mudanças no pH ou força iônica da fase aquosa, a força de interação proteína-polissacarídeo modifica-se da atração para repulsão, ou vice versa (DICKINSON, 2008).

A interação entre proteínas e polissacarídeos aniônicos, como a CMC, ocorre de forma mais intensa em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da

proteína, ou do pKa do polissacarídeo, entretanto estudos recentes demonstraram que há interação mesmo em pH próximo a neutralidade, resultando na formação de complexos solúveis (TOLSTOGUZOV, 1997; BENICHO et al., 2007; KOUFANTIS; KIOSSEOGLOU, 2009).

Em sistemas biopoliméricos, a CMC tem demonstrado capacidade de complexação com proteínas do soro de leite (HANSEN; HIDALGO; GOULD, 1971; GIRARD; TURGEON; PAQUIN, 2002; DAMIANOU; KIOSSEOGLOU, 2006; KIKI; KORLOS; KIOSSEOGLOU, 2007; KOUFANTIS; KIOSSEOGLOU, 2009), com α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (CAPITANI et al., 2007), o que demonstra a compatibilidade do polissacarídeo com diferentes proteínas oriundas do soro de leite, mas na literatura ainda nenhum estudo foi realizado com o CMP, o qual contribui significativamente com as proteínas totais desse subproduto da indústria láctea.

Entender como CMP interage com CMC em sistemas com diferentes concentrações e em condições de pH bem distintas: próximo à neutralidade (pH 6,5), pI do peptídeo e do pKa da CMC (pH 4) e ao pKa do ácido siálico (pH 2) foi o objetivo deste capítulo. Técnicas como infravermelho e espectrofotometria foram usadas para constatar se há interação peptídeo-polissacarídeo e se é química ou eletrostática. Mudanças nas propriedades físicas foram investigadas por diagrama visual e reologia.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

Os ensaios foram realizados utilizando: (i) BioPURE-GMP® caseinomacropeptídeo (CMP) fornecido por DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA). A composição do CMP foi de: proteína (base seca) 82,5% (m/m) (N x 6,47), sendo CMP 90,0% (m/m) (N x 7,07) da proteína total, 0,5% (m/m) gordura, 6,0% (m/m) cinzas e umidade. (ii) carboximetilcelulose (30 FGH – 70520, com alto grau de substituição e alta viscosidade) fornecido pela International Speciality Products - Brasil.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Preparo das amostras

Soluções estoques de CMP (16%) e CMC (1%) foram preparadas em água purificada Milli-Q e mantidas sob refrigeração até a completa dissolução dos componentes. A partir de misturas dessas soluções estoques obtiveram-se as concentrações adequadas do peptídeo e do polissacarídeo nas amostras. O pH 2, 4 e 6,5 foi ajustado utilizando HCl e NaOH (1N).

2.2.2.2 Diagrama visual

O diagrama visual das diferentes soluções contendo o peptídeo (CMP) nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10% (m/v) adicionadas ou não do polissacarídeo (CMC) (0, 0,25 e 0,5% m/v) foi construído baseando-se em observações diárias das amostras num período de 15 dias à temperatura de 25°C.

2.2.2.3 Método espectrofotométrico para avaliação da interação CMP-CMC

A metodologia baseia-se na absorbância máxima do azul de metileno ocorrer a 664 nm, correspondente as moléculas livres do corante, porém

quando o polissacarídeo é adicionado um ombro surge a 615 nm e absorbância a 664 nm diminui, devido à interação desses componentes, o que se acentua com o aumento da concentração do carboidrato.

Soluções aquosas de carboximetilcelulose (CMC) e azul de metileno (AM) na concentração de 1% (m/v) e 0,002% (m/v), respectivamente, foram apropriadamente misturadas para obter uma série de soluções polissacarídeo-corante, onde a concentração final de AM foi de 0,001% e CMC de 0 a 0,5% (m/v). A mudança na taxa de absorbância a 664 e 615 nm, com o aumento da concentração de polissacarídeo na mistura CMC-AM nas soluções, foi observada para determinar a interação entre esses componentes.

Em uma segunda análise, foram utilizados níveis crescentes de CMP (0-16%) adicionados em soluções CMC-AM contendo 0,002% (m/v) de AM e 0,5% (m/v) de CMC em pH 2, 4 e 6,5, para obter as concentrações desejadas (CMP 0-8%, CMC 0,25% e MB 0,001% m/v). O aumento da absorbância a 664 e 615 nm foi observado em função da concentração de CMP, a fim de encontrar uma possível interação entre o polissacarídeo e as moléculas do peptídeo (BENICHO et al., 2007). As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata e os gráficos construídos considerando a razão absorbância 664 e 615 nm (664 / 615 nm).

2.2.2.4 Espectrometria no infravermelho (FTIR)

A análise dos espectros no infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) foi realizada visando caracterizar o CMP e CMC, além de verificar as possíveis interações químicas que ocorreram sob influência do pH (2, 4 e 6,5) e concentração (CMP 4, 6 e 8% e CMC 0-0,5%). Foram preparadas amostras pela mistura de 150 mg de KBr (para espectroscopia no infravermelho, Merck Chemicals International) com 3 mg de cada amostra liofilizada. Esse material foi colocado dentro de um conjunto formatador, sendo as pastilhas formatadas ao aplicar-se, com auxílio de uma prensa hidráulica, uma pressão de 8 ton/cm^2 por 5 minutos.

Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro por transformada de Fourier (FTIR) BioRad modelo FTX 3500 (Hercules, CA, USA), com fonte MIR de carbeto de silício, Beam splitter MIR (KBr estendido), detector MIR

DTGS (sulfato de triglicina deuterada) e função de Apodização Blackman-Harris 3-Term, onde foram realizadas 32 varreduras por amostra com resolução de 4 cm^{-1} . Os resultados dos espectros foram analisados no programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA).

2.2.2.5 Comportamento reológico das soluções

Como a interação entre proteínas e polissacarídeos aniônicos é mais frequente em pH abaixo do ponto isoelétrico, considerou-se interessante aprofundar a pesquisa em pH 6,5. Martinez, Farías e Pilosof (2011) demonstraram que os dímeros de CMP em pH 6,5 a 4,5 estão negativamente carregados, o que provavelmente dificulta a interação nessa faixa de pH com a CMC. Assim sendo, investigou-se a influência da CMC no comportamento reológico das soluções de CMP. Para tanto, utilizou-se reômetro Brookfield modelo DVIII ultra com rotor SC4-31 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA), operando a uma taxa de cisalhamento de 0 a 85 s^{-1} , em temperatura de 25°C . As soluções avaliadas em duplicata continham proporções diferentes de CMP (2, 4, 6, 8 e 10%) e CMC (0, 0,25 e 0,5%).

No caso de polímeros fluidos (DELBEN; STEFANCICH, 1997), o modelo utilizado para ajuste dos dados foi da lei da potência (equação 15), para o qual todas as amostras apresentaram coeficiente de correlação próximos a 1 ($>0,99$). A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA/MANOVA) e teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$), usando o programa Statistica 7.1 (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (15)$$

onde:

τ = tensão de cisalhamento

k = coeficiente de consistência

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento

n = índice de comportamento

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Diagrama visual

Na Figura 12 observa-se o comportamento dos sistemas nos diferentes pHs após 15 dias de observações diárias. Em pH 6,5, as amostras permaneceram em solução, não apresentando separação de fases. No pH 2 todos os ensaios formaram gel, porém nas amostras sem CMC houve precipitação devida provavelmente ao ácido siálico, que possui pKa próximo a esse pH.

Em pH 4 tem-se um sistema complexo, com diferentes eventos ocorrendo. As amostras sem CMC formaram precipitado branco rapidamente, mas em presença do polissacarídeo a precipitação foi postergada. Tal efeito deve-se ao fato da CMC encontrar-se dissociada (pKa 4,4-4,2) (KELLER, 1983). Portanto, os grupos COO^- livres interagem eletrostaticamente com o peptídeo positivamente carregado e essa interação resulta na formação de complexos eletrostáticos com consequente aumento da viscosidade, o que adiou a precipitação (CLUSKEY; THOMAS; COULTER, 1969; KELLER, 1983). Esses complexos CMP-CMC solúveis são formados com as isoformas do peptídeo que se encontram acima do seu pI (gCMP). A ocorrência dessa interação deve-se ao fato de que acima do pI e em condições de força iônica fraca o peptídeo apresenta “*patches*”¹ carregados na superfície (WEINBRECK; TROMP; de KRUIF, 2004), inclusive positivas, devido aos três resíduos de Lys (aminoácido positivamente carregado) (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996) e ao N-terminal, que podem interagir com os grupos carboxílicos da CMC. Em pH 6,5 também formam-se complexos solúveis, como será discutido adiante.

No pH 4 ocorreu também gelificação nas amostras com 10% de CMP, independente da presença de CMC e mesmo com precipitação. Sabe-se que o CMP possui duas modificações pós-traducionais: glicosilada e fosforilada (MIKKELSEN et al., 2005), sendo que a glicosilação resulta em diferentes pI para essas isoformas. É importante ressaltar que no caso do aCMP (forma não glicosilada), uma parcela que pode apresentar-se menos ácida, devido às

¹ Manchas ou regiões.

variantes genéticas da κ -caseína, precipita em pH entre 4,3 e 4,6. No entanto, somente em pH entre 4,0 e 4,1 o aCMP total apresenta-se não carregado. Em pH 4, isoformas de gCMP (forma glicosilada) que contém menos resíduos de ácido siálico apresentam-se no estado isoelétrico, mas apenas em pH 3,15 o gCMP total alcança esse estado (KREUß; STRIXNER; KULOZIK, 2009). Portanto, essas modificações capazes de alterar o pI do CMP explicam a formação de gel em pH 4, uma vez que apenas uma parcela da concentração total (10%) do peptídeo nas amostras precipitou, sendo o restante capaz de formar a rede do gel.

Mais um evento importante foi observado em pH 4, a formação de complexos insolúveis ou coacervados. Esses complexos podem ser formados por proteínas e polieletrólitos como a CMC, em pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína (SACCO; BONNEAUX; DELLACHERIE, 1988). Sendo assim, o complexo aCMP-CMC é responsável por tal evento, o qual pode ser visualizado claramente no destaque da Figura 12, onde esses complexos concentram-se no fundo do tubo deixando o restante da solução límpida, o que é característico de sistemas coacervados (COOPER et al., 2005).

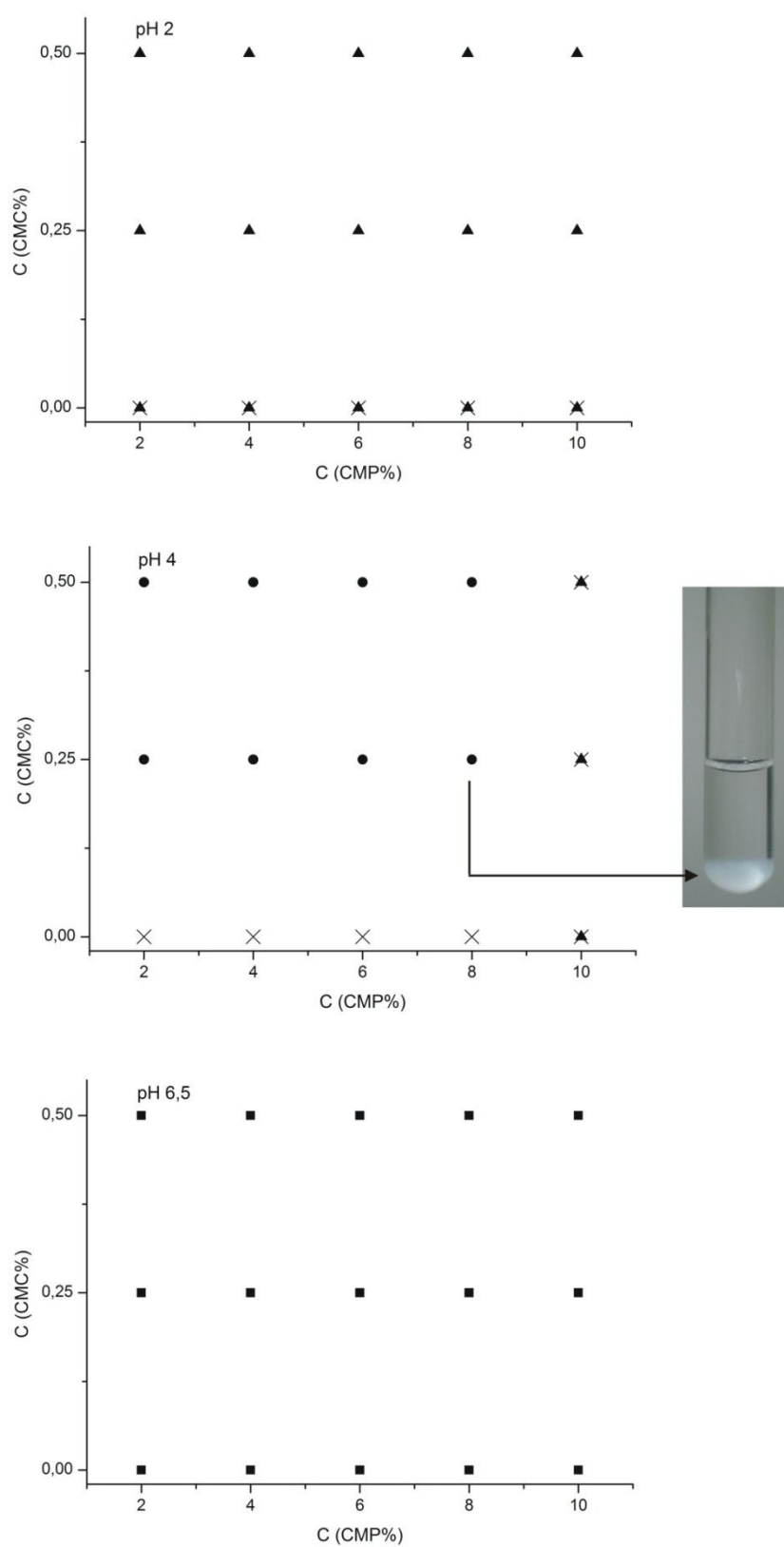


FIGURA 12 – DIAGRAMA VISUAL PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CMP-CMC EM pH 2: X PRECIPITADO, ▲ GEL; pH 4: ● COACERVADO, ▲ GEL, X PRECIPITADO E pH 6,5: ■ SOLUÇÃO

2.3.2 Método espectrofotométrico para avaliação da interação CMP-CMC em solução

De acordo com Michon et al. (2002), há interação entre corante catiônico planar, como o azul de metileno e macromoléculas aniônicas (polissacarídeo aniônico) em soluções diluídas, sendo essa interação responsável por modificação do espectro de absorção visível do corante. Tal fato resulta da formação de complexos entre esses componentes, devido à atração eletrostática do corante pelas regiões negativamente carregadas do polissacarídeo. O AM tem absorção máxima a 664 nm, quando o polissacarídeo é adicionado à solução há mudança no espectro e a máxima absorção ocorre a 615 nm.

Na Figura 13a é possível observar essa mudança na relação Abs_{664}/Abs_{615} em função da adição do polissacarídeo (CMC) no sistema. Com o aumento da concentração de CMC na solução contendo 0,001% de AM, há uma diminuição na absorção a 664 nm e aumento a 615 nm. Essa mudança tende a se estabilizar entre 0,20 e 0,30% de CMC, isso devido às moléculas de AM já estarem ligadas às regiões negativamente carregadas e o excesso de polissacarídeo não interagir (BENICHO et al., 2007).

A influência da adição de CMP na relação Abs_{664}/Abs_{615} em soluções com 0,001% de AM adicionadas de 0,25% de CMC fica evidente na Figura 13b. Fica clara a elevação nos valores de absorbância a 664 nm, isso porque ocorre um deslocamento das moléculas do corante por moléculas do peptídeo, tornando-as livres e como resultado há uma maior absorção nessa região.

O pH interferiu na interação CMP-CMC (Figura 13b), sendo essa mais intensa em pH 2 e 4, mas mesmo em valores próximo à neutralidade (pH 6,5) houve interação, confirmando os resultados obtidos por outros autores (MICHON et al., 2002; BENICHO et al., 2007; KOUPANTSIS, KIOSSEOGLOU, 2009). Isso se deve à formação de complexos solúveis CMP-CMC, considerando que nesse pH o CMP pode apresentar-se na forma de monômeros (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011), esses complexos são formados por aCMP ou gCMP com CMC. A formação desses complexos só é possível porque até pH 6,5 não ocorre desprotonação dos grupos NH_3 da Lys e do N-terminal, o que assegura H^+ nos domínios positivos do CMP para

interagirem com os grupos COO^- do polissacarídeo. De acordo com Lesins e Ruckenstein (1988) e de Vries (2004), esses domínios, positivos e negativos, ocasionam uma distribuição desuniforme de cargas na superfície da proteína, o que favorece interações eletrostáticas, inclusive quando a proteína possui mesma carga que o adsorvente. Outra hipótese é que os íons Na^+ atuam como contra-íons no sistema reduzindo a repulsão entre CMP e CMC.

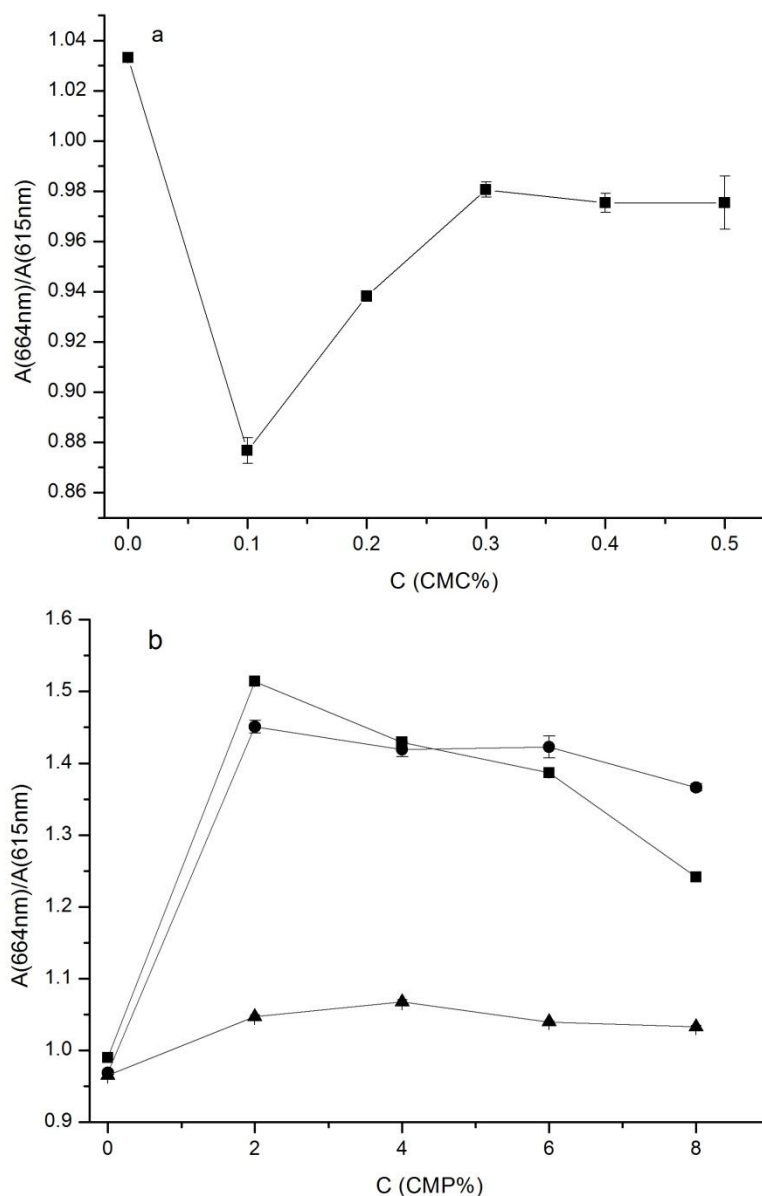


FIGURA 13 – MUDANÇA NOS VALORES DE $\text{Abs}_{664}/\text{Abs}_{615}$ PARA AS SOLUÇÕES COM 0,001% DE AZUL DE METILENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CMC (a); OU PARA AS MISTURAS 0,001% AZUL DE METILENO - 0,25% CMC EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CMP (b) EM pH 2 (■); 4 (●) E 6,5 (▲) À TEMPERATURA DE 25°C. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO

Em pH 2, a interação foi maior que a 4 para concentração de 2% de CMP, porque em pH abaixo de 3,15 todos os dímeros presentes na solução encontram-se positivamente carregados (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011), o que favorece atração eletrostática por grupos carboxílicos carregados negativamente na CMC.

Já na concentração de 4% de CMP os valores da relação Abs_{664}/Abs_{615} foram semelhantes. Para as demais concentrações (6 e 8%) foi maior em pH 4, devido a influência do pH e da concentração na formação dos agregados de CMP. Pois de acordo com Farías, Martinez e Pilosof (2010), em concentrações inferiores a 3% o peptídeo leva um maior tempo para agregar, formar gel. Com a diminuição do pH, mas mesma concentração (4%) de CMP, há um maior grau de associação (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2010). Sendo assim, pode-se afirmar que esses dois fatores, concentração e pH, favorecem a formação de agregados maiores, contudo, esses agregados interferiram no espectro de absorção dessas soluções.

Por outro lado, em concentrações maiores que 2% em pH 2, o declínio na taxa Abs_{664}/Abs_{615} pode sugerir o início de separação de fases nas amostras, mas em escala microscópica, por isso não visualizada no diagrama. Como consequência ocorre uma menor interação entre CMP-CMC, também notada em pH 4 na concentração de 8%. Resultados que evidenciam separação de fases foram encontrados inclusive nas medidas reológicas dinâmicas (dados mostrados no Capítulo 4).

2.3.3 Análises de infravermelho (FTIR)

2.3.3.1 Caracterização do CMP

Na faixa de 3400 a 3300 cm^{-1} , para o espectro do CMP (Figura 14), ocorre uma provável superposição de bandas. Tanto os modos vibracionais de estiramento O-H, livre ou em ligações hidrogênio, como bandas relacionadas a amidas secundárias A (3300 cm^{-1}) e B (3080 cm^{-1}) estão presentes.

De acordo com Twardowski e Anzenbacher (1994), amidas secundárias com configuração *TRANS* apresentam bandas em 3300 e 3100 cm^{-1} , que correspondem a amida A e B, respectivamente. A banda da amida A corresponde ao estiramento da ligação N-H com a formação de ligação hidrogênio e a amida B é resultado da ressonância de FERMI da vibração de estiramento N-H com sobreton da vibração de amida II para configuração *TRANS*, essas bandas estão relacionadas com a prolina.

A 1648 e 1548 cm^{-1} estão as bandas de amida I e II, respectivamente. A banda de amida I é atribuída principalmente ao estiramento C=O da ligação peptídica e é sensível às diferentes conformações da estrutura secundária (MANGAVEL et al., 2001). Amida II é característica da movimentação combinada das vibrações do N-H e estiramento C-N, do grupo CO-NH (LAVIALLE; ADAMS; LEVIN, 1982; BANDEKAR, 1992).

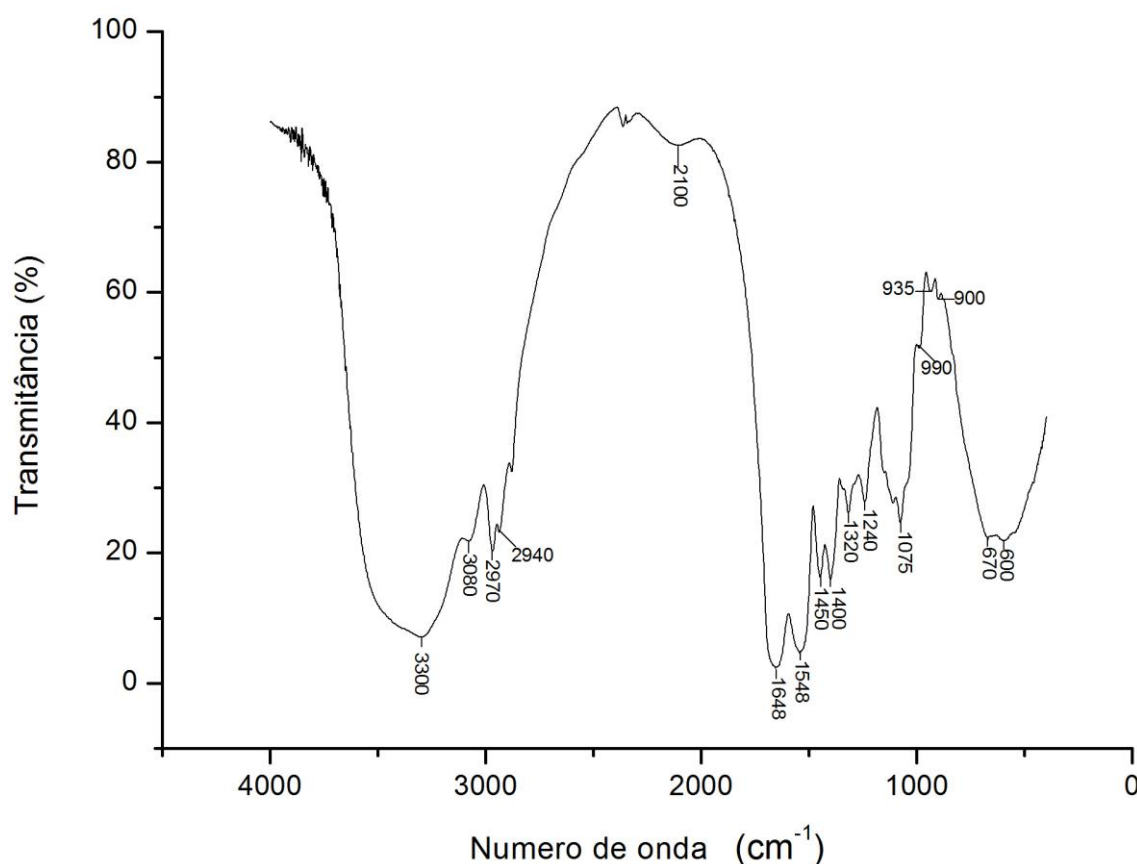


FIGURA 14 – ESPECTRO DE FTIR PARA CMP

Nota-se em 1240 cm^{-1} a banda de amida III, que representa a combinação entre vibrações de estiramento C-N e deformações N-H de ligações amida, como também de balanços (*wagging*) vibracionais de grupos CH_2 da cadeia principal da glicina e das cadeias laterais de prolina (JACKSON et al, 1995). Em 1320 cm^{-1} está a banda atribuída ao grupo amina.

Em 2970 e 2940 cm^{-1} estão as bandas referentes à vibração assimétrica e simétrica do grupo metil (CH_3) (ABRAHAM et al., 2008), a 1450 cm^{-1} deformação CH_2 , sendo a região hidrofóbica do CMP responsável por essas bandas. Em 2100 cm^{-1} deformação axial C=O e 1400 cm^{-1} vibração dos grupos COO^- (NAKAI; LI-CHAN; HIROTSUKA, 1994).

A 1075 cm^{-1} obteve-se a banda que corresponde a resíduos de carboidratos (STEWART, 1965; BARJA; LEMOS; TORANZO, 1989). Uma banda pouco perceptível está situada em 990 cm^{-1} , a mesma resulta de grupos fosfato (PO_4), devido aos sítios fosforilados do peptídeo (Ser 149 e 127) (CARMONA; RODRIGUES, 1986).

As bandas em 935 e 900 cm^{-1} podem estar relacionadas ao monossacarídeo galactose, já em 600 e 670 cm^{-1} tem-se uma provável superposição de bandas, pois entre $800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ocorre uma banda larga resultante da deformação angular fora do plano (*"wagging mode"*) de N-H (ABRAHAM et al., 2008), como também, deformação axial de ligação C-S, devido muito provavelmente à metionina (STUART, 1997).

2.3.3.2 Caracterização CMC

A Figura 15 mostra as bandas encontradas para o CMC. A banda em 3425 cm^{-1} refere-se ao estiramento O-H em ligações hidrogênio intramolecular/intermolecular (TONG; XIAO; LIM, 2008), já em 2930 cm^{-1} ocorre estiramento C-H. Em 2130 cm^{-1} está a combinação das bandas de estiramento COO^- e deformação OH; e a 1602 cm^{-1} identifica-se o sal COO^-Na^+ (ZALESKA et al., 2002).

As bandas em 1420 e 1330 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O em ions COO^- (YUEN et al., 2009), a 1270 cm^{-1} encontra-se o estiramento C-O em ligação glicosídica e em 1160 cm^{-1} o estiramento C-O, já a banda em 1120 cm^{-1} é devido ao estiramento C-C.

Na região de impressão digital do CMC encontram-se as bandas: 1060 cm^{-1} que corresponde ao estiramento e deformação C-OH, 1020 cm^{-1} deformação OH em ligação glicosídica; e 900 cm^{-1} referente à deformação angular C-H.

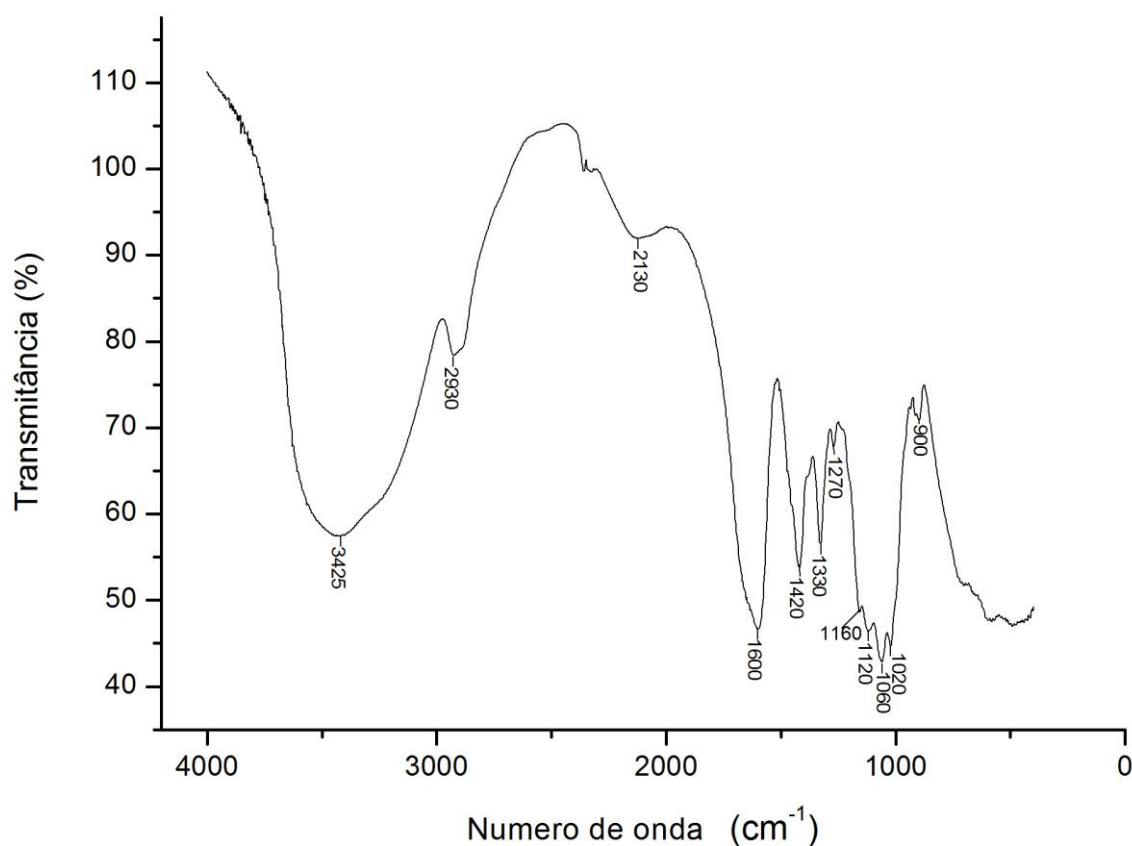


FIGURA 15 – ESPECTRO DE FTIR PARA CMC

2.3.3.3 Influência do pH e da concentração dos componentes na interação CMP-CMC

Para melhor entendimento no texto, as amostras foram designadas como F1 a F9 a pH 2, considerando a concentração de CMP e CMC: F1, F4 e F7 são amostras sem CMC com 4, 6 e 8% de CMP. F2, F5 e F8 são compostas por 4, 6 e 8% de CMP mais 0,25% de CMC. F3, F6 e F9 possuem 4, 6 e 8% de CMP com adição de 0,50% de CMC. As amostras nos demais pHs seguem a mesma organização, sendo designadas como F10 a F18 em pH 4 e F19 a F27 em pH 6,5. Todas as bandas obtidas são apresentadas na Tabela 2 (página 78) e para resumir ao longo do texto foram calculadas a

média e desvio padrão das amostras comparadas nos diferentes momentos da discussão.

Quando se comparam as formulações idênticas, mesma concentração de CMP e CMC, obtidas em diferentes pHs, nota-se a influência desse parâmetro na interação dos componentes, é possível ainda observar a mudança no comportamento e intensidade das bandas na presença do polissacarídeo (Figura 16).

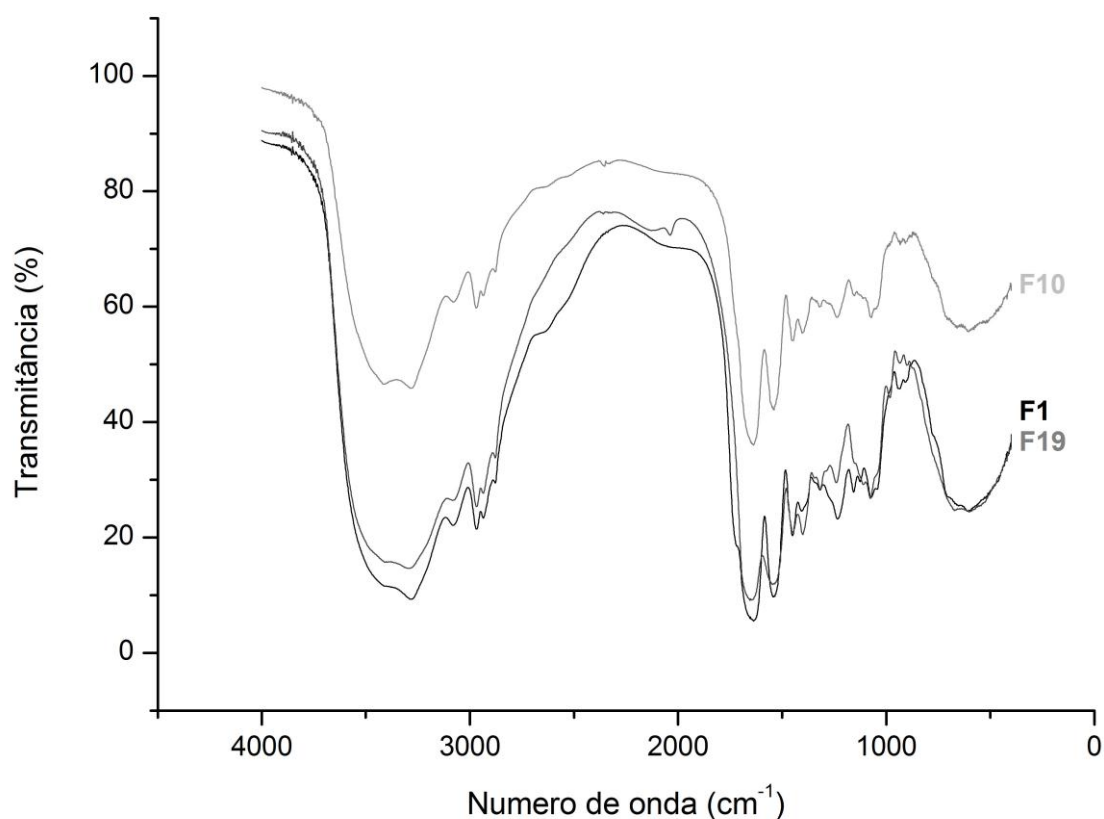


FIGURA 16 – ESPECTROS COMPARATIVOS PARA AS AMOSTRAS COM MESMA CONCENTRAÇÃO DE CMP (4%) E CMC (0%) EM pH: 2 – (F1) , 4 – (F10) E 6,5 – (F19)

De modo geral, a intensidade dos espectros com a mesma concentração de CMP e CMC, mas em pHs diferentes (2, 4 e 6,5), é similar. Contudo na comparação das amostras com concentração de 4% de CMP e sem adição de CMC, F1, F10 e F19 (Figura 16), nota-se uma diferença mais acentuada entre os 3 pHs, devido à precipitação do aCMP em pH 4 (F10), conforme demonstrado no diagrama visual, o que resulta em uma menor concentração de peptídeo solúvel, como também em menor interação entre os monômeros, por fim em bandas com menor intensidade. Porém, quando comparadas as amostras em pH e concentração de peptídeo idênticas, mas com e sem adição de CMC, nota-se que as amostras na presença do carboidrato (0,25 ou 0,5%) têm maior intensidade para todas as bandas do espectro (Figura 17), tal fato evidencia a interação de CMP-CMC. Esses resultados corroboram com os obtidos na espectrofotometria, que também demonstrou uma interação entre os biopolímeros nos pHs do estudo.

TABELA 2 – BANDAS (NÚMERO DE ONDA EM cm^{-1}) OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS

	% CMP (m/m)	% CMC (m/m)	BANDAS (Número de onda em cm^{-1})																
F1	4	0	3407	3281	3083	2968	2936	1638	1542	1450	1407	1317	1233	1157	1126	1075	1043	937	908
F2	4	0,25	3406	3277	3082	2967	2936	1636	1545	1450	1406	1317	1234	1155	1124	1070		934	907
F3	4	0,5	3401	3283	3085	2970	2937	1636	1542	1450	1406	1317	1234	1153	1124	1067		935	906
F4	6	0	3407	3282	3083	2970	2936	1636	1541	1450	1405	1317	1232	1156	1124	1075	1045	933	908
F5	6	0,25	3409	3281	3083	2968	2935	1637	1538	1450	1405	1316	1234	1153	1124	1070		933	906
F6	6	0,5	3401	3283	3084	2968	2936	1638	1536	1451	1407	1320	1234	1156	1125	1070		934	906
F7	8	0	3405	3280	3080	2969	2936	1638	1540	1450	1408	1318	1232	1156	1125	1073	1045	934	908
F8	8	0,25	3407	3281	3082	2969	2936	1638	1541	1450	1407	1316	1231	1157	1123	1071		934	908
F9	8	0,5	3406	3281	3081	2969	2936	1638	1541	1449	1406	1317	1232	1156	1123	1073		934	908
F10	4	0	3410	3280	3081	2971	2936	1640	1540	1450	1405	1320	1235	1153	1070	933		908	
F11	4	0,25	3414	3281	3081	2969	2936	1637	1545	1450	1404	1320	1237		1070	933		907	
F12	4	0,5	3410	3281	3082	2968	2936	1637	1546	1450	1404	1321	1237		1072	933		907	
F13	6	0	3414	3281	3079	2968	2936	1639	1542	1449	1402	1319	1236	1152	1072	933		906	
F14	6	0,25	3407	3284	3082	2968	2936	1638	1542	1449	1404	1320	1236		1071	933		906	
F15	6	0,5	3410	3282	3082	2968	2936	1639	1544	1452	1403	1322	1236		1071	934		906	
F16	8	0	3410	3282	3082	2969	2936	1638	1544	1448	1403	1319	1236	1153	1074	934		906	
F17	8	0,25	3406	3282	3080	2969	2936	1641	1545	1450	1403	1320	1236		1073	933		906	
F18	8	0,5	3406	3282	3082	2969	2936	1638	1541	1448	1404	1321	1237		1071	933		906	
F19	4	0	3410	3290	3082	2967	2936	2038	1648	1545	1450	1401	1317	1239	1076	983	934		900
F20	4	0,25	3411	3293	3085	2968	2936	2038	1649	1547	1448	1403	1320	1240	1075	986	934		900
F21	4	0,5	3407	3298	3084	2967	2936	2039	1648	1545	1448	1403	1320	1241	1075	986	934		899
F22	6	0	3408	3280	3082	2969	2937	2037	1648	1546	1449	1402	1317	1239	1076	983	934		900
F23	6	0,25	3407	3299	3087	2969	2937	2038	1648	1546	1449	1402	1319	1241	1076	984	933		898
F24	6	0,5	3406	3294	3087	2968	2937	2038	1646	1545	1449	1403	1320	1241	1074		934		900
F25	8	0	3410	3281	3080	2969	2937	2038	1647	1544	1448	1401	1317	1239	1076	982	934		901
F26	8	0,25	3410	3281	3083	2969	2936	2038	1649	1545	1448	1402	1318	1239	1076	982	934		900
F27	8	0,5	3410	3285	3083	2969	2936	2038	1648	1544	1449	1402	1318	1240	1075	984	934		899

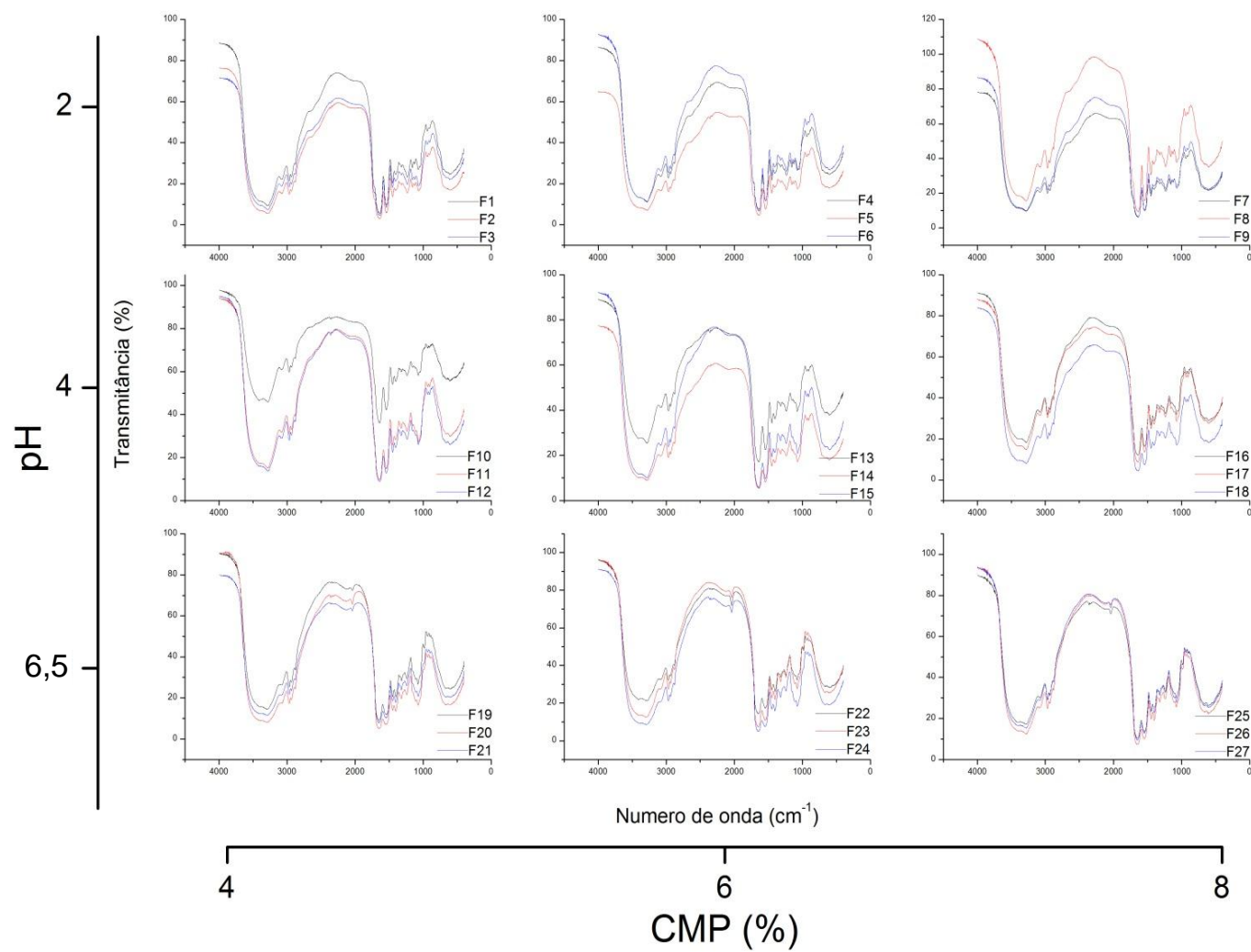


FIGURA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE ESPECTROS DAS TRÊS AMOSTRAS EM MESMA CONCENTRAÇÃO DE CMP E pH, SENDO A PRIMEIRA SEM ADIÇÃO DE CMC, A SEGUNDA COM 0,25% E A TERCEIRA COM 0,50%

Em pH 6,5 surgem duas bandas estreitas e de baixa intensidade em $2038 \pm 0,5$ e $983,75 \pm 1,58 \text{ cm}^{-1}$, as mesmas não estão presentes nas amostras a outros pHs. A primeira pode estar relacionada à desprotonação e consequente formação de grupos CO negativamente carregados nas cadeias laterais de Asp e Glu do CMP, em pH superior a 4 (OKUNO et al., 2003). O comportamento da banda em $1402,11 \pm 0,78 \text{ cm}^{-1}$ reforça esse fato, uma vez que essa mostra-se mais acentuada em pH 6,5, pois a forma ionizada dos grupos carboxílicos apresenta uma banda a $1400\text{-}1420 \text{ cm}^{-1}$, enquanto que a forma COOH em $1700\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ (NAKAI; LI-CHAN; HIROTSUKA, 1994). A banda em $984 \pm 1,58 \text{ cm}^{-1}$ também pode ser atribuída à desprotonação, mas dos grupos PO_4 , o que ocasionou um deslocamento da banda relacionada em 990 cm^{-1} do CMP (média \pm desvio padrão das amostras F19 a F27 nesse parágrafo).

Mudanças na banda de amida I em 1648 cm^{-1} para o CMP, foram mais acentuadas em pH 2 ($1637 \pm 0,97$) e 4 ($1639 \pm 1,33$) do que 6,5 ($1648 \pm 0,93$). Isso está relacionada com uma maior modificação na estrutura secundária do peptídeo e maior exposição de grupos funcionais em pH ácido.

As bandas a $1072 \pm 2,65$ (média \pm desvio padrão das amostras F1 a F9) e $1044 \pm 1,1 \text{ cm}^{-1}$ (média \pm desvio padrão das amostras F1, F4, e F7) em pH 2 referem-se ao esqueleto C-O-C e evidenciam a competição entre os grupos COO^- do ácido siálico e CMC por grupos positivamente carregados do peptídeo. Na primeira ocorrem modificações na presença da CMC e a segunda só está presente nas amostras na ausência do polissacarídeo, este último fato também ocorre com a banda $1153 \pm 0,58 \text{ cm}^{-1}$ em pH 4, atribuída a ligação C-O.

Modificações na intensidade e frequência das bandas, bem como o surgimento de novas bandas, estão relacionadas à ocorrência e ao tipo de interações entre os componentes em sistemas biopoliméricos. Gerrero et al. (2010), comparando a região entre $1200\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$ em filmes de proteína de soja com glicerol, perceberam que não houve mudanças nos picos característicos dos componentes obtidos individualmente, o que levou os autores a concluir que a interação ocorreu sem formação de ligações covalentes. Gonzaga et al. (2005) ressaltam que as bandas no intervalo de $1000\text{-}1171 \text{ cm}^{-1}$ determinam a presença inclusive de O-acetil éster, o que para

Xie et al. (2010) possibilitou especular sobre a presença de complexos proteína-glucano. Entretanto Lii et al. (2002) estudaram a interação entre CMC e gelatina em pHs alcalinos, onde observaram o aparecimento de uma banda não relacionada aos espectros desses polímeros, como também modificações na banda de amida I, o que possibilitou descrever a formação de complexos por ligações químicas entre o grupo COO^- da CMC e amida I da proteína. Mediante o exposto e de acordo com os resultados obtidos, pode-se supor que a presença ou ausência das bandas descritas anteriormente, em razão do pH ou adição do polissacarídeo, relaciona-se com modificações conformacionais devido à interação eletrostática entre CMC e CMP. Uma vez que a banda de amida I modificou-se de forma mais acentuada em razão do pH do que da presença do polissacarídeo, reforçando a ausência de ligações covalentes.

A banda de amida secundária trans em $3281 \pm 1,80$; $3282 \pm 1,12$ e $3289 \pm 7,48 \text{ cm}^{-1}$ em pH 2, 4 e 6,5 (médias \pm desvio padrão das amostras em cada pH) sofreu maiores alterações em pH próximo à neutralidade, o que demonstra a interação entre os grupos COO^- da CMC e N-terminal do peptídeo, reforçando que também ocorre interação e que não há desprotonação dos grupos NH_3^+ nesse pH. A banda de ligações O-H obteve maiores modificações em pH 2 e 4 ($3405 \pm 2,74$ e 3410 ± 3) do que em pH 6,5 ($3409 \pm 1,79$).

2.3.4 Comportamento reológico

De acordo com a Tabela 3 da análise de variância, os valores de p ($<0,05$) mostram-se significativos, o que evidencia a variância entre os resultados obtidos para os parâmetros de índice de comportamento (n) e coeficiente de consistência (k), sendo esses influenciados pela concentração de CMP e CMC de forma individual, como também por sua interação. Na Tabela 4 é possível entender de forma mais clara a importância dos componentes na solução.

TABELA 3 - ANOVA/MANOVA PARA OS PARÂMETROS REOLÓGICOS k E n

	Valor	F	Efeito gl*	Erro gl*	p
Intercept	0,00	28250,11	2	14	0,00
CMP	0,08	8,58	8	28	0,00
CMC	0,00	649,41	4	28	0,00
CMP*CMC	0,04	7,33	16	28	0,00

*gl = grau de liberdade. k = coeficiente de consistência, n = índice de comportamento.

Os valores para o índice de comportamento (n) (Tabela 4) excedem a unidade nas soluções contendo apenas CMP, diferindo estatisticamente entre si apenas da solução com 2%, sendo iguais para as demais (8, 6, 10 e 4%). Percebe-se que não apenas a concentração de CMP influenciou os valores obtidos para o referido parâmetro, mas também a proporção de CMC adicionada, uma vez que quanto menos polissacarídeo acrescido às amostras maiores os valores de n . Na presença apenas do peptídeo as soluções apresentaram comportamento dilatante, independente da concentração, enquanto que para as amostras adicionadas de CMC obteve-se comportamento pseudoplástico, como pode ser confirmado nas curvas de fluxo apresentadas na Figura 18 (página 84).

Walkenström et al. (1999) estudaram a influência do comportamento reológico na agregação de WPI (proteína isolada de soro de leite) em suspensões puras e adicionadas de goma xantana, onde perceberam que essas mudanças no comportamento do fluxo favoreceram a formação de agregados menores e o comportamento dilatante nas soluções de WPI, já quando a goma xantana foi adicionada o comportamento observado foi pseudoplástico. Esses dados corroboram com os obtidos para o presente

estudo, uma vez que Martinez, Farias e Pilosof (2011) sugerem que as diferentes formas de CMP interagem hidrofobicamente constituindo dímeros (aCMP-aCMP, aCMP-gCMP, gCMP-gCMP), negativamente carregados em pH entre 6,5 e 4,5. Tal fato nos permite supor que as amostras apresentaram comportamento dilatante devido ao sistema ser formado por agregados menores, dímeros densamente empacotados. Esses agregados espalham-se na fase líquida formando espaços vazios quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, o que dificulta a capacidade do solvente de lubrificar e preencher esses interstícios formados, como resultado surgem forças de tensão superficial que tornam o sistema mais sólido (GLICKSMAN, 1982).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS k E n ENTRE AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CMP E CMC

CMP (%)	CMC (%)	k (média \pm desvio padrão)*	CMP (%)	CMC (%)	n (média \pm desvio padrão)*
4	0,50	$2,97 \pm 0,17^a$	8	0	$1,32 \pm 0,04^a$
2	0,50	$2,56 \pm 0,19^{ab}$	6	0	$1,31 \pm 0,00^a$
6	0,50	$2,51 \pm 0,31^{ab}$	10	0	$1,29 \pm 0,00^a$
8	0,50	$2,15 \pm 0,28^b$	4	0	$1,26 \pm 0,01^a$
10	0,50	$1,52 \pm 0,06^c$	2	0	$1,15 \pm 0,07^b$
10	0,25	$0,34 \pm 0,05^d$	6	0,25	$0,91 \pm 0,00^c$
2	0,25	$0,30 \pm 0,02^d$	8	0,25	$0,90 \pm 0,03^c$
4	0,25	$0,29 \pm 0,02^d$	4	0,25	$0,89 \pm 0,01^c$
8	0,25	$0,25 \pm 0,04^d$	2	0,25	$0,88 \pm 0,01^{cd}$
6	0,25	$0,25 \pm 0,00^d$	10	0,25	$0,87 \pm 0,03^{cd}$
10	0	$0,02 \pm 0,00^d$	10	0,50	$0,85 \pm 0,00^{cde}$
2	0	$0,01 \pm 0,00^d$	8	0,50	$0,77 \pm 0,02^{def}$
8	0	$0,01 \pm 0,00^d$	6	0,50	$0,74 \pm 0,02^{fe}$
4	0	$0,01 \pm 0,00^d$	2	0,50	$0,73 \pm 0,01^f$
6	0	$0,01 \pm 0,00^d$	4	0,50	$0,72 \pm 0,01^f$

*Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). k = coeficiente de consistência, n = índice de comportamento.

Oposto ao ocorrido para o parâmetro n , no coeficiente de consistência (k), as amostras contendo apenas CMP obtiveram os menores valores, precedidos por aquelas com 0,25 e 0,50% de CMC, tal fato elucida a influência da presença e também do acréscimo na concentração do polissacarídeo nesse parâmetro (Tabela 4).

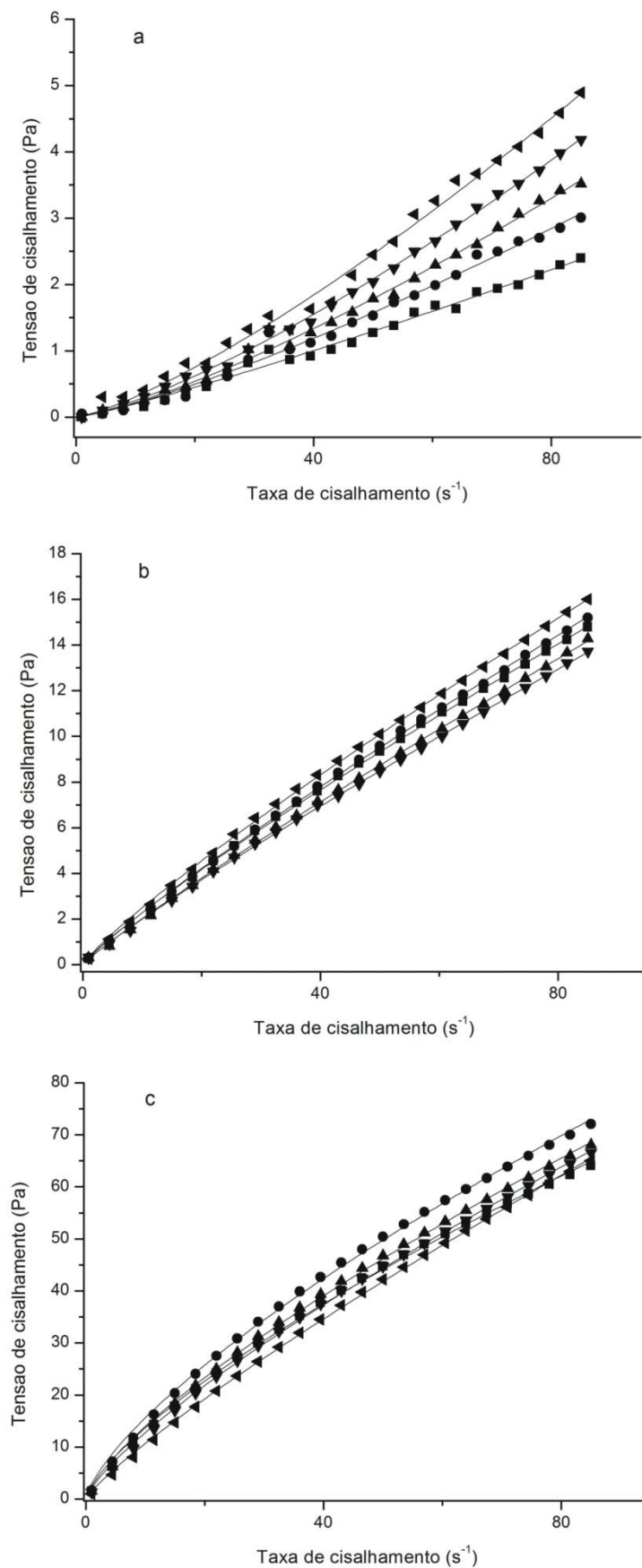


FIGURA 18 – CURVAS DE FLUXO PARA AS SOLUÇÕES CONTENDO CMP (2% ■, 4% ●, 6% ▲, 8% ▼ e 10% ◀) (a), MAIS 0,25% (b) E 0,50% (c) DE CMC

Os valores de viscosidade aparente (η_{ap}) à taxa de cisalhamento de 50 s⁻¹ foram avaliados para todas as amostras e de acordo com a Tabela 5 houve variância entre as médias.

TABELA 5 - ANOVA/MANOVA PARA VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) À TAXA DE CISALHAMENTO DE 50 s⁻¹

	Valor	F	Efeito gl*	Erro gl*	p
Intercept	0,00	22738,02	2	14	0,00
CMP	0,15	5,38	8	28	0,00
CMC	0,00	377,95	4	28	0,00
CMP*CMC	0,06	5,40	16	28	0,00

*gl = grau de liberdade

Na Tabela 6 percebe-se que as amostras com os maiores valores são as adicionadas de 0,50% de CMC, seguidas das com 0,25%; e por fim as sem adição. Esses resultados permitem admitir uma interação positiva entre CMP-CMC, confirmando os resultados obtidos por outras análises do trabalho que apontam para a formação de complexos solúveis em pH 6,5.

TABELA 6 - VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) A TAXA DE CISALHAMENTO DE 50s⁻¹

CMP (%)	CMC (%)	Viscosidade aparente (média ± desvio padrão)*
4	0,50	0,99 ± 0,01 ^a
6	0,50	0,92 ± 0,02 ^b
8	0,50	0,89 ± 0,03 ^b
2	0,50	0,88 ± 0,01 ^{bc}
10	0,50	0,84 ± 0,02 ^c
10	0,25	0,20 ± 0,01 ^d
4	0,25	0,19 ± 0,01 ^d
2	0,25	0,19 ± 0,00 ^d
6	0,25	0,17 ± 0,00 ^d
8	0,25	0,17 ± 0,00 ^d
10	0	0,05 ± 0,00 ^e
8	0	0,04 ± 0,00 ^e
6	0	0,04 ± 0,00 ^e
4	0	0,03 ± 0,00 ^e
2	0	0,03 ± 0,00 ^e

*Médias ± desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 19 (a) observa-se o aumento da viscosidade aparente (η_{ap}) com o aumento da taxa de cisalhamento, o que confirma o comportamento dilatante do fluido contendo apenas CMP, já para as soluções adicionadas de 0,25 (b) e 0,50% (c) de CMC fica evidente o comportamento pseudoplástico. De acordo com Alves (2002), os fluidos pseudoplásticos têm diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento, isso devido a forças hidrodinâmicas que se tornam mais intensas provocando ruptura progressiva e alongamento do sistema, o que resulta num alinhamento com o escoamento e por consequência a redução na viscosidade.

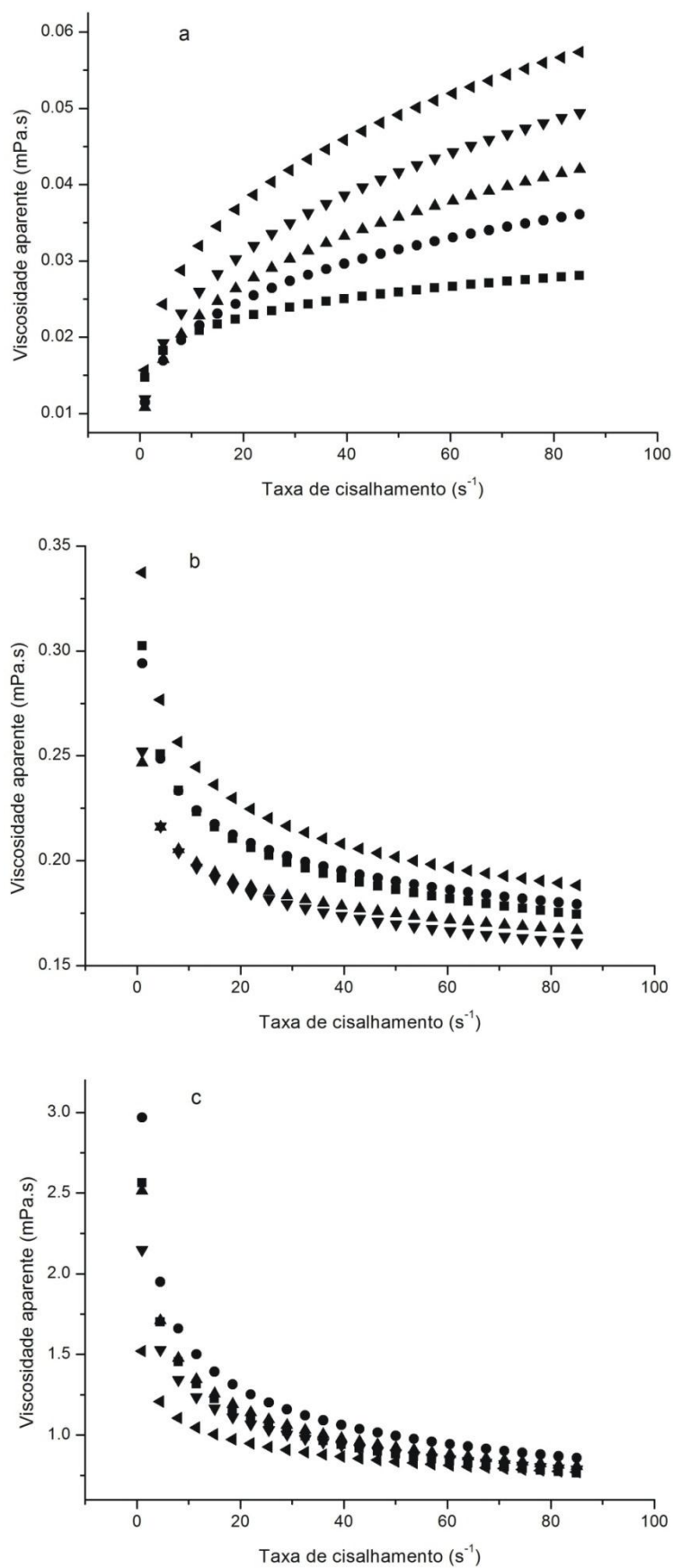


FIGURA 19 – VISCOSIDADE APARENTE PARA AS SOLUÇÕES CONTENDO CMP (2% ■, 4% ●, 6% ▲, 8% ▼ e 10% ◄) (a), MAIS 0,25% (b) E 0,50% (c) DE CMC

2.4 CONCLUSÃO

Os resultados de FTIR demonstram que a interação entre CMC e CMP é eletrostática. Em pH 2, a CMC evitou a precipitação. No pH 4 houve formação de complexos CMP-CMC solúveis e insolúveis, mas ocorreu separação de fases em concentração de 8% do peptídeo, conforme resultados obtidos por espectrofotometria. A separação de fases também foi evidente em pH 2, mas acima de 2%. Em pH 6,5 também ocorre a formação de complexos solúveis, confirmado pelo aumento na viscosidade das amostras com CMC, o comportamento reológico mudou de dilatante para pseudoplástico na presença do polissacarídeo. Não houve separação de fases a pH 6,5.

Agradecimentos

À pesquisadora Lucimara A. Forato do Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento da Instrumentação Agropecuária CNPDIA - EMBRAPA – São Carlos – SP; Grazielli da Rocha – Laboratório de Espectroscopia Vibracional de Infravermelho - DQUI-UFPR.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. P.; SAJAN, D.; JOE, I. H.; JAYAKUMAR, V. S. Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of p-amino acetanilide. **Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 355-367, 2008.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Effect of High-Hydrostatic Pressure and Temperature on Rheological Characteristics of Glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1535-1540, 2003.

ALVES, M. M. M. The rheology. In A. G. Castro (Ed). **The chemistry and rheology in the food processing**. Lisboa, Portugal: Instituto Piaget. 2002. p. 37-61.

BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1120, p.123-143, 1992.

BARJA, J. L.; LEMOS, M. L.; TORANZO, A. E. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, p. 1674-1679, 1989.

BENICHOU, A.; ASERIN, A.; LUTZ, R.; GARTI, N. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 379-391, 2007.

BURTON, J.; SKUDDER, P. J. Whey proteins. UK Patent Application GB 2188526 A1. 1987.

CAPITANI, C.; PÉREZ, O. E.; PACHECO, B.; TERESA, M., PILOSO, A. M. R. Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1344-1354, 2007.

CARMONA, P.; RODRIGUEZ, M. L. Hydrogen bonding between phosphate and amino acid side chains. **Journal of Molecular Structure**, v. 143, p. 365-368, 1986.

CÈSARO, A.; CUPPO, F.; FABRI, D.; SUSSICH, F. Thermodynamic Behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, v. 388, p. 143-153, 1999.

CHABANCE, B.; JOLLES, P.; IZQUIERDO, C.; MAZOYER, E.; FRANCOUAL, C.; DROUET, L. Characterization of an antithrombotic peptide from k-casein in newborn plasma after milk ingestion. **British Journal of Nutrition**, v. 3, p. 583-590, 1995.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v. 80, p. 155-165, 1998.

CHOBERT, J. M.; TOUATI, A.; BERTRANDHARB, C.; DALGALARRONDO, M.; NICOLAS, M. G. Solubility and emulsifying properties of k-casein and its caseinomacropeptide. **Journal of Food Biochemistry**, v. 13, p. 457-473, 1989.

CLUSKEY, F. J.; THOMAS, E. L.; COULTER, S. T. Precipitation of Milk Proteins by Sodium Carboxymethylcellulose. **Journal Dairy Science**, v. 52, p. 1181-1185, 1969.

COOLBEAR, K. P.; ELGAR, D. F.; AYERS, J. S. Profiling of genetic variants of bovine k-casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 1055-1068, 1996.

COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte - protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 52-78, 2005.

DAMIANOU, K.; KIOSSEOGLOU, V. Stability of emulsions containing a whey protein concentrate obtained from milk serum through carboxymethylcellulose complexation. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 793–799, 2006.

DELBEN, F.; STEFANCICH, S. Interaction of Food Proteins with Polysaccharides I: properties upon Mixing. **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 325-346, 1997.

DELFOUR, A.; JOLLES, J.; ALAIS, C.; JOLLES, P. Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, p. 452-455, 1965.

de VRIES, R. Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point. **The Journal of Chemical Physics**, v. 120, p. 3475-3481, 2004.

DICKINSON, E. **An Introduction to Food Colloids**. Oxford:Oxford Science Publishers.1992

DICKINSON, E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. **Soft Matter**, v. 4, p. 932-942, 2008.

DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's [kappa]-casein. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 1017-1044, 1996.

FARÍAS, M. E.; MARTINEZ, M. J.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH dependent self-assembly and cold gelation. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 79-88, 2010.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; PAQUIN, P. Emulsifying properties of whey protein-carboxymethyl cellulose complexes. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 113-119, 2002.

GLICKSMAN, M. Functional properties of hydrocolloids. In: **Food Hydrocolloids**. v. 1, M. Glicksman (Ed), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1982, p. 47-99.

GONZAGA, M. L. C.; RICARDO, N. M. P. S.; HEATLEY, F.; SOARES, D. A. S. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 43-49, 2005.

GUERRERO, P.; RETEGI, A.; GABILONDO, N.; DE LA CABA, K. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 145-151, 2010.

HANSEN, P. M.; HIDALGO, J.; GOULD, I. A. Reclamation of whey protein with carboxymethyl cellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 54, p. 830-834, 1971.

JACKSON, M.; CHOO, L. P.; WATSON, P. H.; HALLIDAY, W. C.; MANTSCH, H. H. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1270, p. 1- 6, 1995.

KELLER, J. D. Sodium carboxymethylcellulose (CMC). In M. Glicksman (Ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. **Food Hydrocolloids**, v. 3, p. 43-109, 1983.

KIKA, K.; KORLOS, F.; KIOSSEOGLOU, V. Improvement, by dry-heating, of the emulsion-stabilizing properties of a whey protein concentrate obtained through carboxymethylcellulose complexation. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1153-1159, 2007.

KOUPANTSIS, T.; KIOSSEOGLOU, V. Whey protein-carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1156-1163, 2009.

KREUß, M.; STRIXNER, T.; KULOZIK, U. The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1818-1826, 2009.

LAVIALLE, F.; ADAMS, R. G.; LEVIN, I. W. Infrared spectroscopic study of the secondary structure of melittin in water, 2-chloroethanol, and phospholipid bilayer dispersions. **Biochemistry**, v. 21, p. 2305-2312, 1982.

- LESINS, V.; RUCKENSTEIN, E. Patch controlled attractive electrostatic interactions between similarly charged proteins and adsorbents. **Colloid and Polymer Science**, v. 266, p. 1187-1190, 1988.
- LII, C.; TOMASIK, P.; ZALESKA, H.; LIAW, S.; LAI, V. M. F. Carboxymethyl cellulose-gelatin complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 19-26, 2002.
- MANGAVEL, C.; BARBOT, J.; POPINEAU, Y.; GUÉGUEN, J. Evolution of wheat gliadins conformation during film formation: a Fourier transform infrared study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 867-872, 2001.
- MARSHALL, S. C. Casein macropeptide from whey-A new product opportunity. **Food Research Quarterly**, v. 51, p. 86-91, 1991.
- MARTÍN-DIANA, A. B.; FRÍAS, J.; FONTECHA, J. Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 363-367, 2005.
- MARTINEZ, M. J.; FARÍAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 580-588, 2010.
- MARTINEZ, M. J.; FARÍAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 869-867, 2011.
- MATIN, M. A.; OTANI, H. Release of cytotoxic glycopeptides from human acid casein fraction by the action of stomach proteinases. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 6-10, 2000.
- MICHON, C.; KONATE, K.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B. Gelatin/carrageenan interactions in coil and ordered conformations followed by a methylene blue spectrophotometric method. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 613-618, 2002.
- MIKKELSEN, T. L.; FRØKJÆR, H.; TOPP, C.; BONOMI, F.; IAMETTI, F.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; BARKHOLT, V. Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4228-4238, 2005.
- MOLLÉ, D.; LEONIL, J. Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LS-ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**, v. 15, p. 419-428, 2005.
- MONNAI, M.; OTANI, H. Effect of bovine κ -caseinoglycopeptide on secretion of interleukin-1 family cytokines by P388D1 cells, a line derived from mouse monocyte/macrophage. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 192-196, 1997.

NAKAI, S.; LI-CHAN, E.; HIROTSUKA, M. Raman spectroscopy as a probe of protein structure in food systems. In R. Y. Yada, R. L. Jackman, J. L. Smith (Eds.), **Protein structure-function relationships in Food**. London: Blackie Academic and Professional. 1994. p. 163-197.

OKUNO, D.; IWASE, T.; SHINZAWA-ITOH, K.; YOSHIKAWA, S.; KITAGAWA, T. FTIR Detection of Protonation/Deprotonation of Key Carboxyl Side Chains Caused by Redox Change of the Cu_A-Heme a Moiety and Ligand Dissociation from the Heme a₃-Cu_B Center of Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 7209-7218, 2003.

OTANI, H.; MONNAI, M. Induction of an interleukin-1 receptor antagonist-like component produced from mouse spleen cells by bovine k-caseinoglycopeptide. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 1166-1168, 1995.

OTANI, H.; MONNAI, M.; KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, H.; TANIMOTO, M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine κ-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 349-357, 1995.

OTANI, H.; HORIMOTO, Y.; MONNAI, M. Suppression of interleukin-2 receptor expression on mouse CD4⁺T cells by bovine k-caseinoglycopeptide. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 1017-1019, 1996.

SACCO, D.; BONNEAUX, F.; DELLACHERIE, E. Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 10, p. 305-310, 1988.

STEWART, J. E. Far infrared spectroscopy. In S. K. Freeman (Ed.), **Interpretive spectroscopy**. New York: Reinhold Publishing Corp. p.131-169. 1965.

STUART, B. Biological applications of infrared spectroscopy. In J. Wiley & Sons (Eds.), **Analytical Chemistry**. Chichester UK: Open Learning. 1997.

TOLSTOGUZOV, V. Protein-polysaccharide interactions. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, Inc, p. 171-198, 1997.

TONG, Q.; XIAO, Q.; LIM, L. T. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. **Food Research International**, v. 41, p. 1007-1014, 2008.

TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, P. Raman and IR Spectroscopy. In M. Masson (Ed.). **Biology and Biochemistry**. Warsaw: Polish Scientific Publishers. p. 229. 1994

WALKENSTRÖM, P.; NIELSEN, M.; WINDHAB, E.; HERMANSSON, A.-M. Effects of flow behaviour on the aggregation of whey protein suspensions, pure or mixed with xanthan. **Journal of Food Engineering**, v. 42, p. 15-26, 1999.

WEINBRECK, F.; TROMP, R. H.; DE KRUIF, C. G. Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1437-1445, 2004.

YUEN, S.; CHOI, S.; PHILLIPS, D. L.; MA, C. Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1091-1098, 2009.

XIE, J.; XIE, M.; NIE, S.; SHEN, M.; WANG, Y.; LI, C. Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1626-1632, 2010.

ZALESKA, H.; TOMASIK, P.; LI, C. -Y. Formation of carboxymethyl cellulose-casein complexes by electrosynthesis. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 215-224, 2002.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA ÁGUA POR RELAXAÇÃO DE PRÓTONS ^1H PARA OS SISTEMAS COM CASEINOMACROPEPTÍDEO E CARBOXIMETILCELULOSE

RESUMO

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de baixo campo foi utilizada para avaliar o comportamento da água nos sistemas. Em paralelo, rampas de temperatura foram conduzidas nas amostras em pH 2 para identificar a formação de ligações hidrogênio na estruturação da rede dos géis. A viscosidade complexa (η^*) também foi avaliada em razão da frequência para essas amostras. A água interage de forma distinta na superfície dos biopolímeros de acordo com o pH. Em pH 2 há compartimentação da água e a adição de CMC restringe mais a movimentação, dependendo da concentração do peptídeo, embora o polissacarídeo tenha capacidade plastificante em alguns sistemas. Em pH 4, a água interage pouco com os demais componentes, devido à proximidade ao ponto isoelétrico do CMP e maior afinidade com CMC. Em pH 6,5, a interação com água parece ser pouco significativa em termos de força de ligação, resultando em maior mobilidade das moléculas na presença do polissacarídeo.

3.1 INTRODUÇÃO

Combinações de proteínas e polissacarídeos são muito utilizadas em alimentos, uma vez que a interação entre esses componentes pode resultar em melhoria nas propriedades tecnológicas desses sistemas. Em solução, pode ocorrer atração ou repulsão entre proteínas e polissacarídeos, devido a fatores como origem, pH, força iônica, temperatura, concentração ou cisalhamento a que são submetidos (DICKINSON, 1992; DELBEN; STEFANCICH, 1997; CÈSARO et al., 1999; Weinbreck et al., 2003).

Caseinomacropéptido (CMP) é um péptido terminal composto por 64 aminoácidos resultantes da clivagem da κ -caseína na ligação Phe105-Met106 no processo fabril do queijo com o uso de quimosina. O CMP é liberado no soro, enquanto o restante da κ -caseína precipitada na massa (DELFOUR et al, 1965).

Carboximetilcelulose (CMC) é um hidrocolóide linear aniônico obtido por esterificação da glicose, a fim de obter um hidrocolóide solúvel a temperatura ambiente e com estabilidade a uma grande faixa de pH (4 a 10) (HIRATA; SOUZA; PESSOA, 1993). A interação de CMC com proteínas pode auxiliar na solubilidade proteica e estabilizar a solução dependendo das condições de pH, força iônica e relação estequiométrica (FEDDERSEN; THORP, 1993). A viscosidade como também outras medidas físicas podem ser usadas para avaliar essa interação (GANZ, 1977; GLICKSMAN, 1982; KELLER, 1983; TOLSTOGUZOV, 1998; CAPITANI et al., 2007; TONG; XIAO; LIM, 2008; KOUPANTISIS; KIOSSEOGLOU, 2009).

O estado físico da água e sua dinâmica são da maior importância em alimentos. Isso devido à sua influência sobre a estabilidade durante o armazenamento, textura e propriedades funcionais (DUCKWORTH, 1975; PIYASENA; CHAMBERS, 2003; HINRICHS; GOTZ; WEISSER, 2003; BERTRAM et al., 2005). Informações importantes sobre a água podem ser obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN).

RMN baseia-se no fenômeno das partículas com momento angular (spin) e magnético, ocorrendo também movimento de precessão sob ação de um campo magnético externo (B_0). O ^1H apresenta essa característica, devido

à rotação em torno do próprio eixo, o único próton presente gera seu próprio campo magnético tornando o átomo um dipolo.

Quando amostras são submetidas à ação de um campo magnético, os prótons de ^1H se orientam de acordo com a direção do campo aplicado, porém podem se posicionar paralelo ou antiparalelo a esse campo. Esses posicionamentos representam dois níveis de energia: baixa energia (paralelo), maior energia (antiparalelo).

Na tentativa de alinhamento com o campo e devido ao spin ocorre o movimento de precessão. Que é a mudança do eixo de rotação dos prótons para uma frequência ω determinada pela equação de Larmor (equação 16):

$$\omega = \gamma \cdot B_0 \quad (16)$$

γ = razão magnetogírica

B_0 = valor do campo magnético externo aplicado

A relaxação dos spins é causada pelas trocas de energia entre spins e entre spins e sua vizinhança. Essas interações são chamadas de spin-spin (T_2) e spin-rede (T_1), sendo responsáveis pelo retorno do vetor de magnetização ao equilíbrio (alinhado a B_0) em taxas definidas, dependendo do ambiente nuclear (GIDLEY, 1992).

T_2 é a redução da magnetização no plano transversal (equação 17) influenciada por interação dipolo-dipolo, descrita pela equação de decaimento da magnetização no plano transversal:

$$M_{xy} = M_0 \cdot e^{-\frac{1}{T_2}} \quad (17)$$

M_{xy} = magnetização no plano xy ou magnetização transversal;

M_0 = magnetização inicial;

T_2 = tempo de relação transversal.

Em vista do exposto, o objetivo deste capítulo foi obter os valores de relaxação transversal (T_2) a fim de entender o comportamento da água nos sistemas sob influência do pH e da adição de carboximetilcelulose.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

Os ensaios foram realizados utilizando: (i) BioPURE-GMP® caseinomacropéptido (CMP) fornecido por DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA). A composição do CMP foi de: proteína (base seca) 82,5% (m/m) (N x 6,47), sendo CMP 90,0% (m/m) (N x 7,07) da proteína total, 0,5% (m/m) gordura, 6,0% (m/m) cinzas e umidade. (ii) carboximetilcelulose (30 FGH – 70520, com alto grau de substituição e alta viscosidade) fornecido pela International Speciality Products - Brasil.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Preparo das amostras

Soluções estoques de CMP (16%) e CMC (1%) foram preparadas em água purificada Milli-Q e mantidas sob refrigeração até a completa dissolução dos componentes. A partir de misturas das soluções estoques obtiveram-se as concentrações adequadas do peptídeo e do polissacarídeo nas amostras. O pH 2, 4 e 6,5 foi ajustado utilizando HCl e NaOH (1N). As amostras em pH 2 foram designadas com F1 a F9, considerando a concentração de CMP e CMC: F1, F4 e F7 são amostras sem CMC com 4, 6 e 8% de CMP. F2, F5 e F8 são compostas por 4, 6 e 8% de CMP mais 0,25% de CMC. F3, F6 e F9 possuem 4, 6 e 8% de CMP com adição de 0,50% de CMC. As amostras nos demais pHs seguem a mesma organização, sendo designadas como F10 a F18 em pH 4 e F19 a F27 em pH 6,5.

3.2.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN) de baixo campo

As medidas foram realizadas em um ímã supercondutor Oxford Instruments (Tubney Woods, Abingdon, Oxfordshire OX13 5QX, UK) de 2.1 Tesla (85 MHz para ^1H) e com 30 cm de bore. A parte eletrônica consiste de um console de RMN Apollo, um amplificador de potência 2035 AMT e um pré-amplificador AU1448 da Miteq. As curvas de relaxação de Carr–Purcell–Meibom–Gill (CPMG) (MEIBOOM; GILL, 1958) foram obtidas para as amostras a 25°C. Vinte scans foram acumulados para melhorar a taxa sinal-ruído, com uma espera de 10 s entre cada scan. O espaçamento (τ) de pulso foi definido como 10 μs a 90° e 180° pulsos. O número de ecos foi 500. Os ensaios foram conduzidos em triplicata no Laboratório de Instrumentação Nuclear do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2.2.3 Medidas reológicas

Haake Mars Rheometer (Karlsruhe, Germany), com software Haake Rheowin 1.3, operando com rotor P20 Ti L (20,006 mm), em sistema de placas paralelas (gap = 1 mm), foi utilizado nas análises oscilatórias. A temperatura foi controlada por UTM - Universal Temperature Module Controller (Karlsruhe, Germany).

Inicialmente foram realizadas varreduras de tensão para a determinação do intervalo de viscoelasticidade linear nas frequências de 0,05; 0,1 e 1 Hz. Com uma tensão de 2 Pa, varreduras de frequência de 0,1 a 10 Hz foram efetuadas para a obtenção dos valores de viscosidade dinâmica complexa (η^*) em função da frequência. As análises foram realizadas em triplicata a 25°C.

Para avaliar possíveis mudanças nas interações envolvidas na auto-montagem dos géis em presença de CMC, amostras foram preparadas e após o ajuste do pH 2, 750 μL foram transferidos imediatamente para o sistema de placas paralelas. Parafina líquida foi adicionada nas bordas da placa para prevenir a desidratação das amostras que foram avaliadas à frequência de 1

Hz e tensão de 2 Pa. As amostras foram aquecidas de 20 a 100°C em velocidade de 2°C/min. Na sequência, foram resfriadas a 20°C a 8°C/min. O ponto de gel foi considerado como o cruzamento entre as curvas de G' (módulo elástico ou de armazenamento) e G'' (módulo viscoso ou de dissipação).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

T_2 é o tempo de relaxação transversal das moléculas de água, que é muito sensível à interação dessas com os componentes solvatados (SLICHTER, 1990). Tanto proteínas como polissacarídeos podem ligar, imobilizar ou interagir superficialmente com a água, o que resulta em um efeito plastificante com aumento no volume livre permitindo maiores movimentações moleculares desses polímeros (HILLS; TAKACS; BELTON, 1990; SCHMIDT; LAI, 1991; KERR; WICKER, 2000).

Os termos água “livre” (associado com T_2 longo) e água “ligada” (associado com T_2 curto) devem ser usados com cuidado, pois outros fatores podem influenciar os tempos de relaxação aparentes. O comportamento da relaxação da água é controlado principalmente por troca de prótons com grupos hidroxila de polissacarídeos e depende da acessibilidade e concentração desses grupos, em casos específicos da compartimentação da água no gel (HILLS; CANO; BELTON, 1991).

Os valores de T_2 para as amostras foram expressos por uma única exponencial. Diferente do que ocorre em outros sistemas, como por exemplo, em vegetais, onde se têm valores de T_2 distintos para água nos diferentes ambientes do alimento, vacúolo, citoplasma e parede celular (HILLS; REMIGEREAU, 1997; HILLS, 1998). Hansen et al. (2009) também trabalharam com valor único para a constante de tempo de relaxação de géis de amido e gelatina.

3.3.2 Amostras gelificadas em pH 2

Ligações cruzadas, de hidrogênio ou covalentes afetam significativamente a relaxação transversal, ocasionando maior rigidez às cadeias e consequentemente decréscimo nos valores de T_2 (HILLS; TAKACS; BELTON, 1989). Como a interação entre CMC e CMP é puramente eletrostática, conforme demonstrado por análises de FTIR (Capítulo 2), não há modificações drásticas nos valores de T_2 na comparação das amostras F1, F2 e F3 (Figura 20). Os valores de T_2 para essas amostras foram de $398 \pm 1,57$, $387,65 \pm 1,54$ e $376,97 \pm 1,27$ ms. Isso demonstra que a presença do polissacarídeo nas amostras F2 (0,25%) e F3 (0,50%) afetou a estrutura da rede do gel, ocasionando maior emaranhamento das cadeias no sistema com 4% de CMP em pH 2. Esses resultados são condizentes com os valores para viscosidade complexa (η^*) apresentados na Figura 21, uma vez que quanto maior a viscosidade menor a mobilidade das moléculas, por conseguinte maior a dificuldade do material em escoar. Pode-se afirmar então que houve uma interação associativa entre os componentes nessas amostras, que resultou numa maior rigidez da matriz e por isso valores de T_2 menores pra F2 e F3.

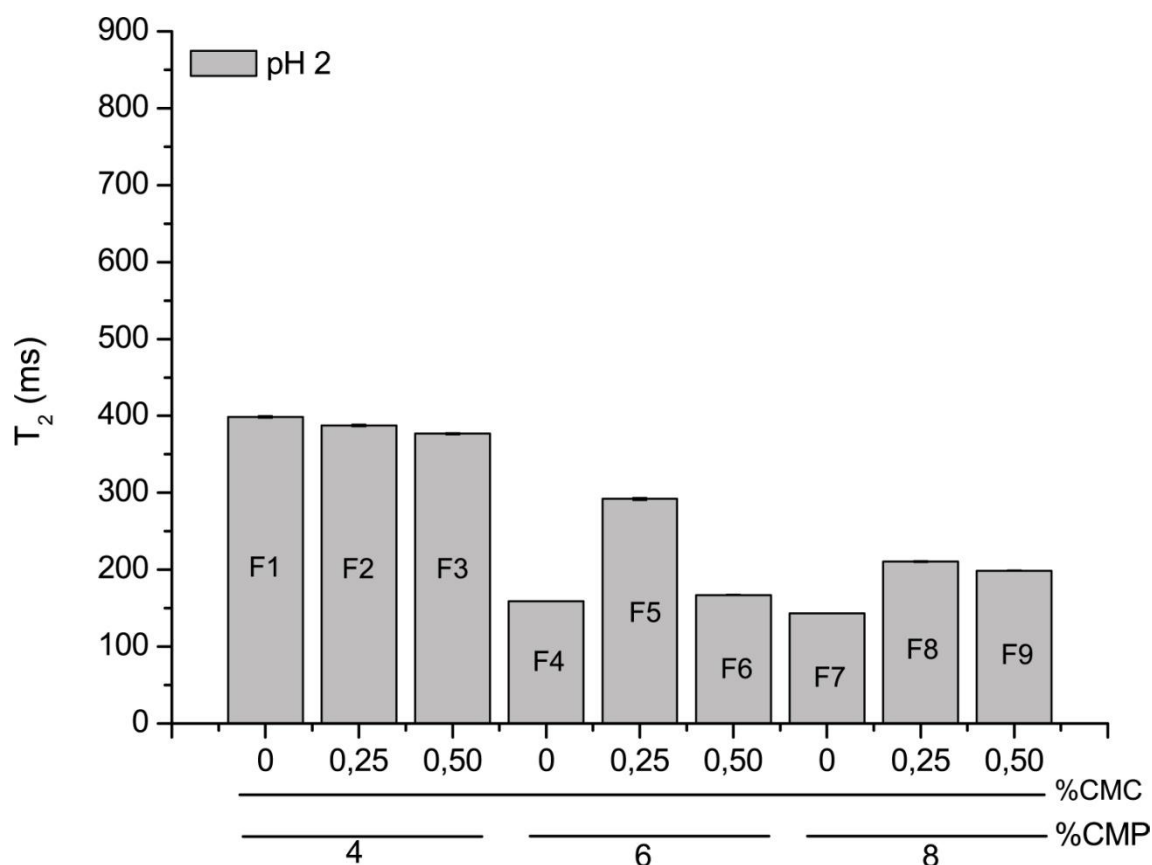


FIGURA 20 – VALORES DE T_2 PARA AS AMOSTRAS GELIFICADAS EM pH 2

Nas amostras com 6 e 8% de CMP (Figura 20) houve modificações mais acentuadas na presença de CMC. Os valores obtidos para F4, F5 e F6 são $159,17 \pm 0,59$, $292 \pm 1,95$ e $167,19 \pm 0,99$ ms. Em F7, F8 e F9 obteve-se valores de $143,17 \pm 0,52$, $198,67 \pm 1,08$ e $210,87 \pm 0,86$ ms para T_2 . Esse aumento da T_2 ocorre em razão do polissacarídeo atuar como agente plastificante, pois aumenta o volume livre das cadeias de CMP. O mecanismo que explica esse efeito deve-se ao fato do peptídeo se aglomerar rapidamente para formar a rede de gel. Como a gelificação ocorre antes da separação de fases macroscópica (VALIM; CAVALLIERI; CUNHA, 2009; PERRECHIL; BRAGA; CUNHA, 2009), o polissacarídeo fica preso mecanicamente nos poros da rede formada por blocos de CMP. Na ausência de CMC os poros são menores e o gel tem característica mais homogênea (Capítulo 4). Esse maior distanciamento dos blocos ocasionado por aumento dos poros resulta no efeito plastificante que enfraquece a rede e diminui a viscosidade complexa (η^*) (Figura 21) para essas amostras que apresentaram separação de fases.

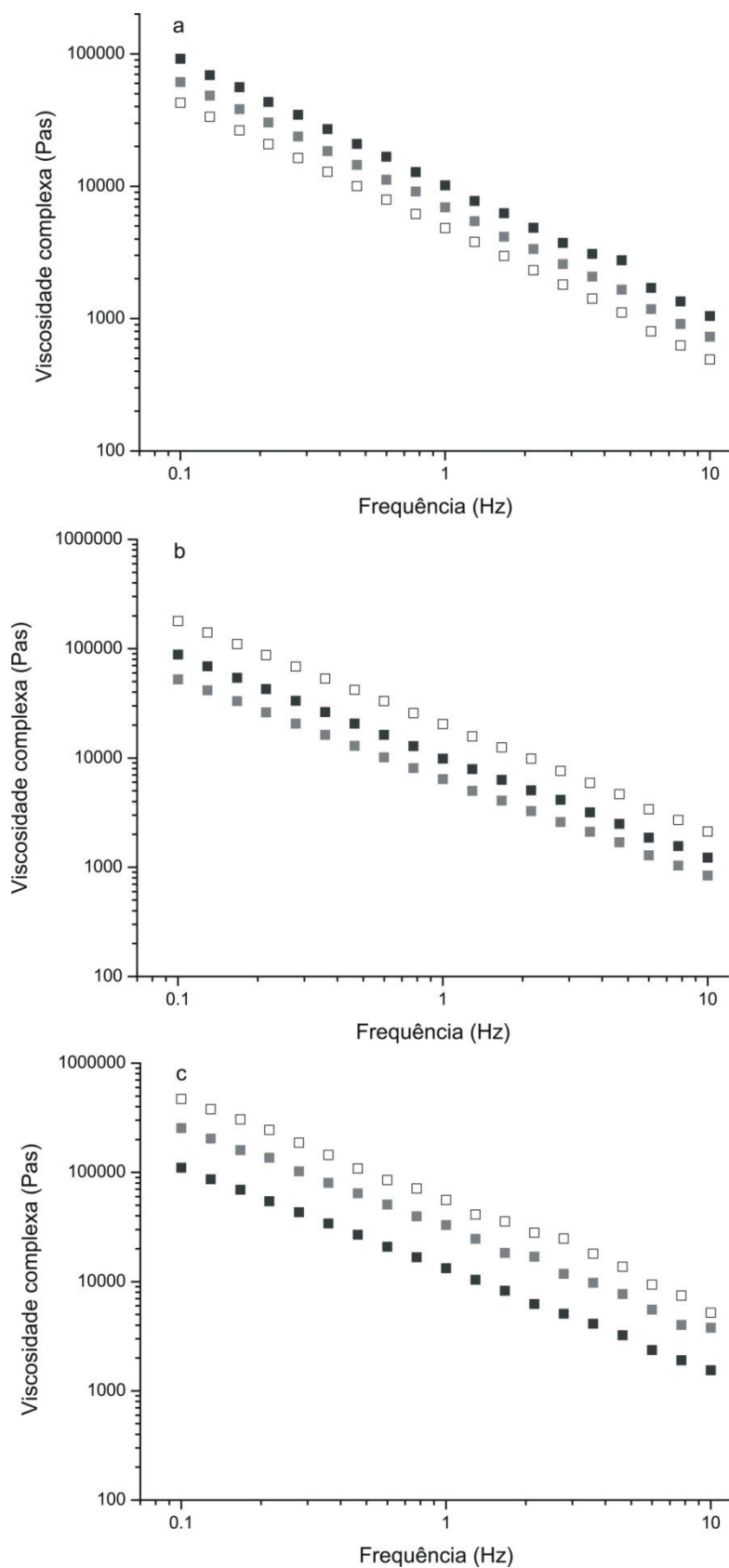


FIGURA 21 – VISCOSIDADE COMPLEXA DAS AMOSTRAS F1-3 (a), F4-6 (b) E F7-9 (c). F1, 4 E 7: SEM CMC (□), F2, 5 E 8: 0,25% DE CMC (■) E F3, 6 E 9: 0,50% DE CMC (◐)

Em pH 2 pode-se afirmar que a estrutura de gel se dá devido a dois tipos de interações físicas: primeiro hidrofóbicas entre monômeros de CMP e na sequência eletrostáticas entre dímeros e constituintes maiores (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011). Ao se observar as Figuras 22, 23 e 24 percebe-se que não há acréscimo nos valores de G' (módulo elástico) com a diminuição da temperatura. Sendo que a consolidação de forças atrativas como Van der Waals e ligações hidrogênio ocasionam aumento em G' (LAMSAL, et al., 2007) e sua estabilidade aumenta com a diminuição da temperatura (SPERONI, et al., 2009). Com base nesses dados, é possível afirmar que ligações de hidrogênio têm pouca efetividade nesses sistemas, ou seja, ocorrem em pequenas quantidades, o que reforça o fato da compartimentação da água ser mais efetiva nas modificações nos valores de T_2 . O tempo de gelificação das amostras foi menor com adição de CMC, sendo que em algumas rampas de temperatura há presença de dois pontos de gel, o que se atribui aos dois mecanismos de auto-montagem (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011). Interessante notar que em alguns sistemas G' (módulo elástico) é maior que G'' (módulo viscoso) desde o início da análise, para posteriormente sofrer queda e novamente ascender, esse comportamento é devido ao caráter mais sólido dos aglomerados formados já no início da constituição da estrutura.

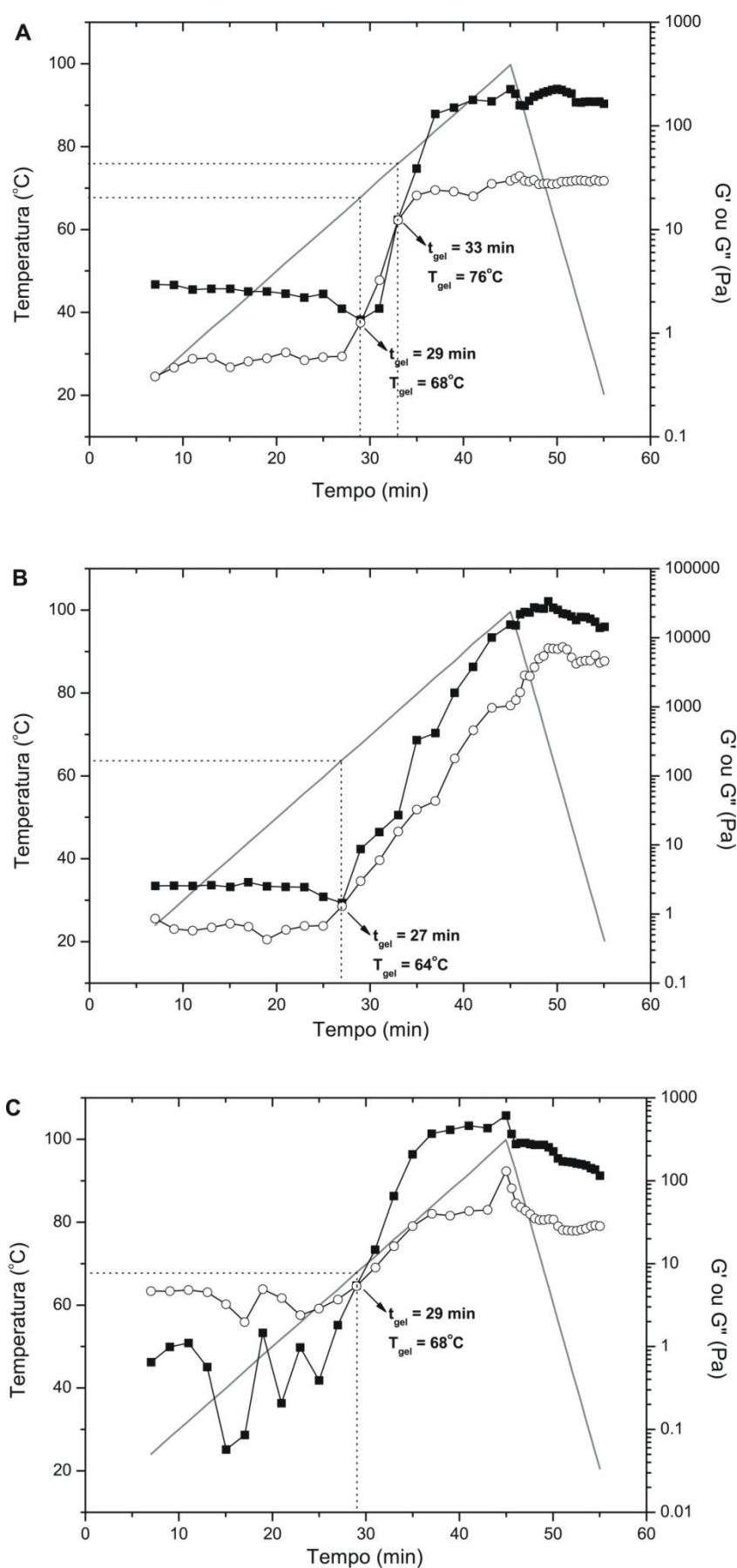


FIGURA 22 – RAMPA DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS F1 (A), F2 (B) E F3 (C). G' (■), G'' (○), AQUECIMENTO 20 - 100°C E RESFRIAMENTO DE 100 - 20°C (—)

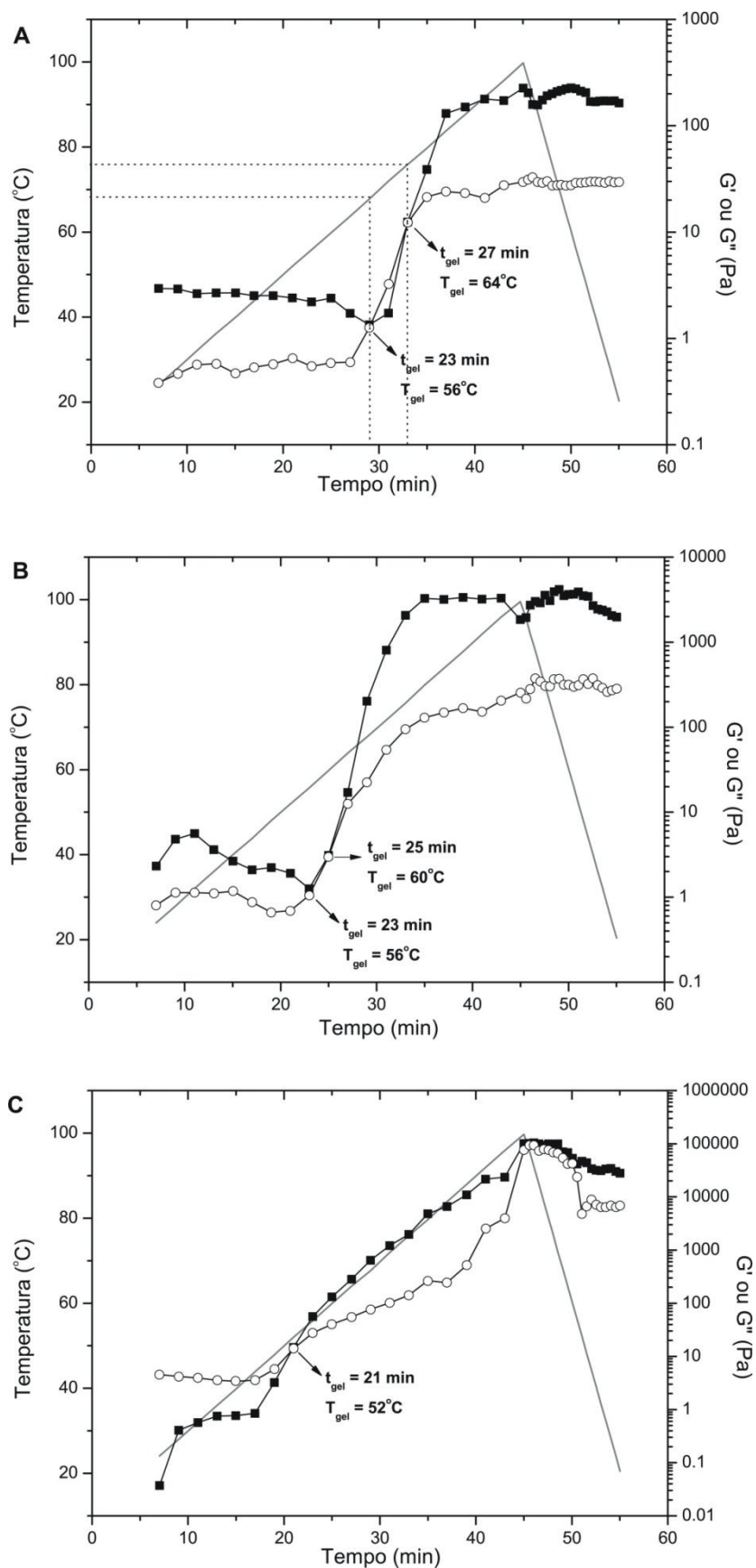


FIGURA 23 – RAMPA DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS F4 (A), F5 (B) E F6 (C). G' (■), G'' (○), AQUECIMENTO 20 - 100°C E RESFRIAMENTO DE 100 - 20°C (—)

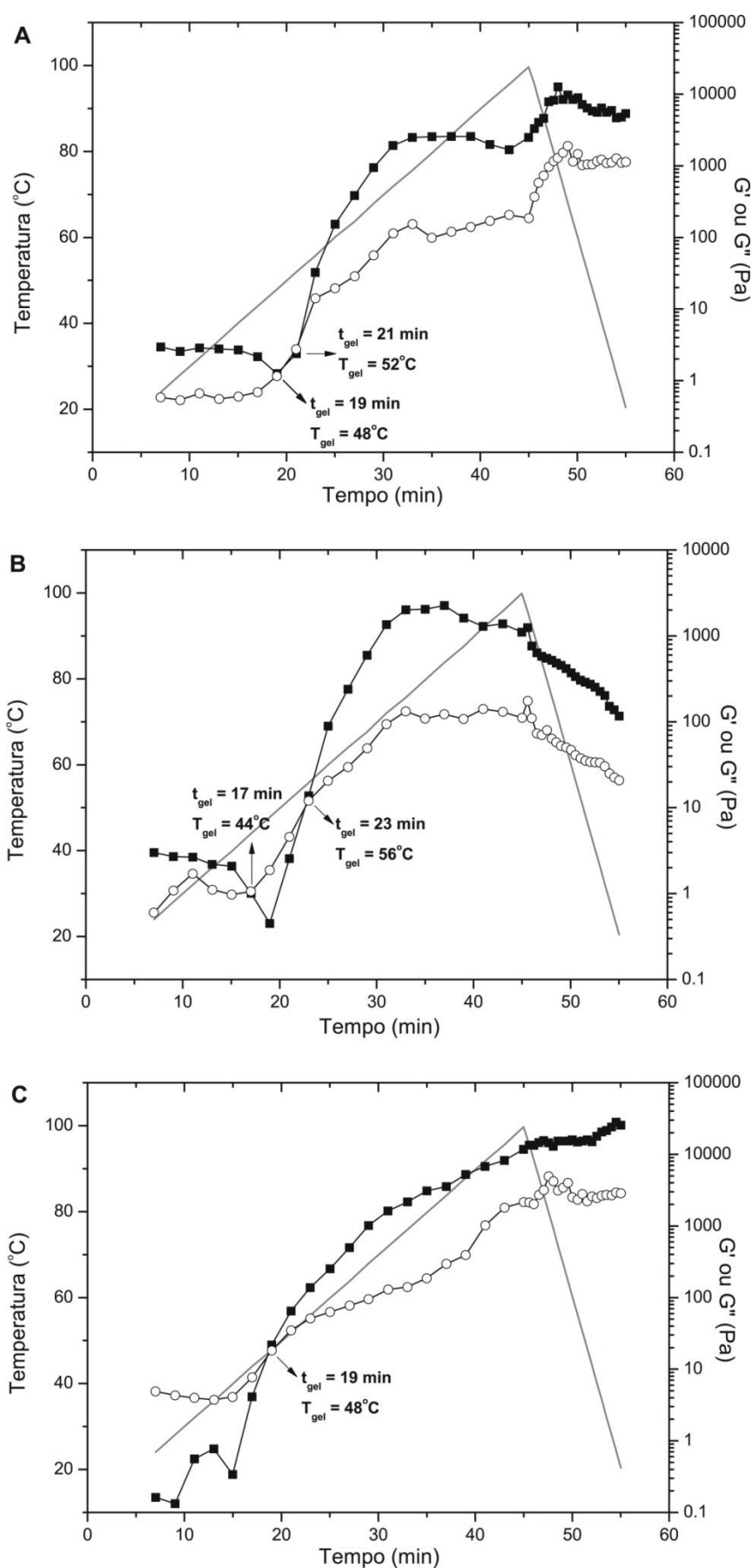


FIGURA 24 – RAMPA DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS F7 (A), F8 (B) E F9 (C). G' (■), G'' (○), AQUECIMENTO 20 - 100°C E RESFRIAMENTO DE 100 - 20°C (—)

3.3.3 Amostras em pH 4

Na Figura 25 estão os resultados para as amostras em pH 4. Observa-se um comportamento homogêneo nessas amostras, com aumento significativo nos valores de T_2 na presença de CMC. F10, F11 e F12 alcançaram tempos de relaxação transversal da ordem de $1904,71 \pm 16,99$, $2208,81 \pm 13,30$ e $2185,76 \pm 14,89$ ms. Para F13, F14 e F15, os valores foram de $1782,76 \pm 15,22$, $2112,77 \pm 20,13$ e $2025,53 \pm 15,08$. F16, F17 e F18: $1590,35 \pm 10,28$, $2199,74 \pm 15,74$ e $1887,47 \pm 19,56$ ms. A explicação para esse aumento é a forte atração entre os componentes nesse pH. Como está próximo ao ponto isoelétrico, as moléculas de CMP apresentam-se menos hidratadas e associam-se ao CMC para formar coacervados deixando a água livre.

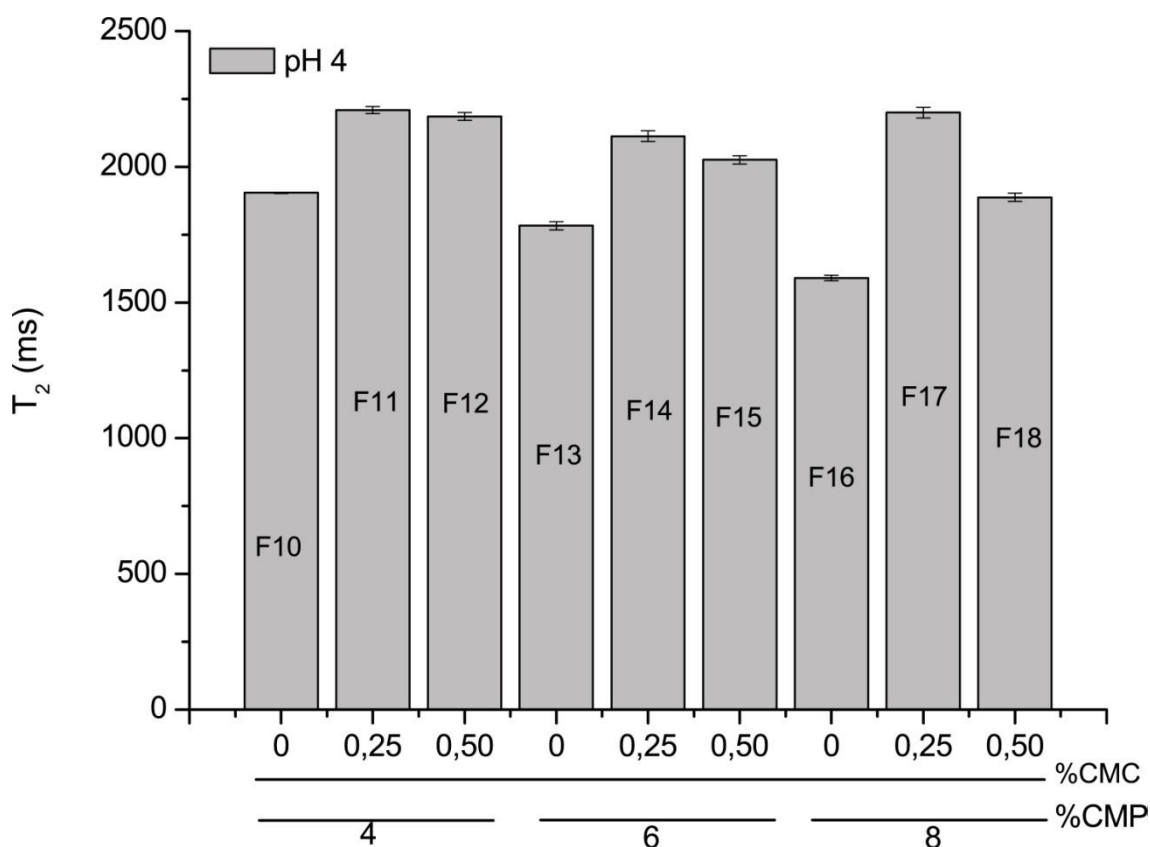


FIGURA 25 – VALORES DE T_2 PARA AS AMOSTRAS EM pH 4

3.3.4 Amostras em pH 6,5

Em pH 6,5 (Figura 26), os valores de T_2 também aumentaram com adição de CMC nas amostras. Sendo para F19, F20 e F21 $1825,86 \pm 14,35$, $2144,26 \pm 19,71$ e $2057,64 \pm 21,39$ ms. F22, F23 e F24: $1757,54 \pm 19,50$, $2025,34 \pm 39,48$ e $1964,74 \pm 20,17$ ms. F25, F26 e F27: $1481,82 \pm 13,30$, $1909,37 \pm 30,39$ e $1781,55 \pm 46,98$ ms.

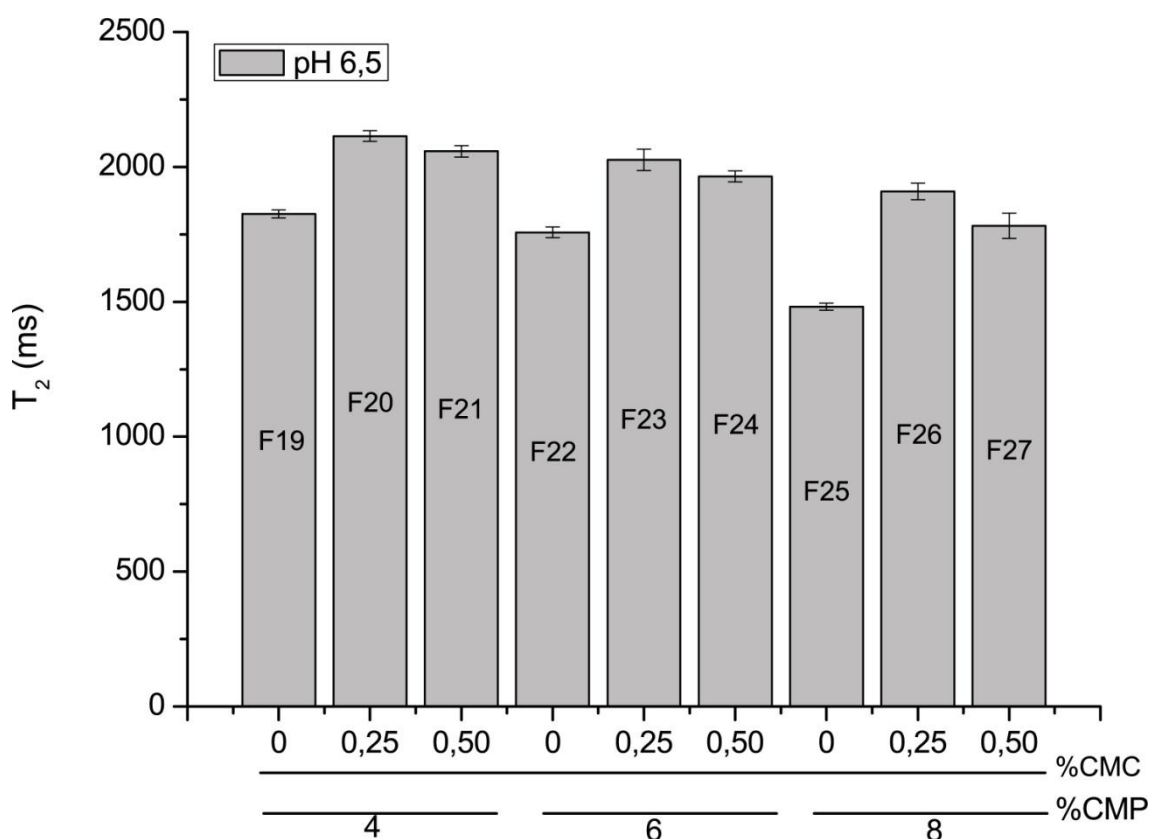


FIGURA 26 – VALORES DE T_2 PARA AS AMOSTRAS EM pH 6,5

Uma explicação plausível para esse acréscimo se dá devido à presença de elevado número de grupos carboxílicos esterificados nas moléculas de CMC. Isso significa que as moléculas de água se organizam em clatratos (gaiolas) em torno desses grupos éster. Como consequência, há a perda de mobilidade da água, porém a interferência nos valores da relaxação transversal é diminuta em comparação com ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo, que causam maior rigidez no movimento das moléculas envolvidas (KERR; WICKER, 2000). São possíveis ainda outras explicações. Como as amostras permanecem em solução, há uma distância maior entre as cadeias,

diminuindo o número de ligações por molécula de água, o que dá maior mobilidade. Outra possibilidade é que com adição de CMC houve um aumento no volume livre dos sistemas, devido à interação associativa entre o peptídeo e o polissacarídeo. Conforme ocorreu também com a adição de 0,5% de goma xantana em amostras contendo gelatina em condições de baixa umidade (20%), onde houve acréscimo no volume livre, atribuído a uma afinidade positiva entre os polímeros, resultando em uma diminuição do volume total ocupado pelos polímeros (ALTAY; GUNASEKARAN, 2012).

3.3.5 Mudanças no tempo de relaxação transversal (T_2) com o pH

De modo geral, com aumento na concentração de CMP há uma diminuição da T_2 nas amostras (Figura 27). Em pH 2 esse comportamento deve-se a dois fatores distintos: a) há um aumento na densidade e força da rede, o que resulta em uma diminuição do espaço físico livre entre os blocos que formam a estrutura, gerando uma compartimentação maior das moléculas de água e conseqüentemente perda de mobilidade. b) o aumento da concentração do peptídeo resulta na formação de maior número de ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo entre CMP e o solvente, tornando as moléculas de água quimicamente imobilizadas.

Menores valores de T_2 foram observados em pH 2, em razão do estado gelificado das amostras, que se explica devido ao movimento restrito das moléculas na rede tridimensional, portanto há uma troca de energia de rotação rápida com as moléculas de água circundantes (KERR; WICKER, 2000).

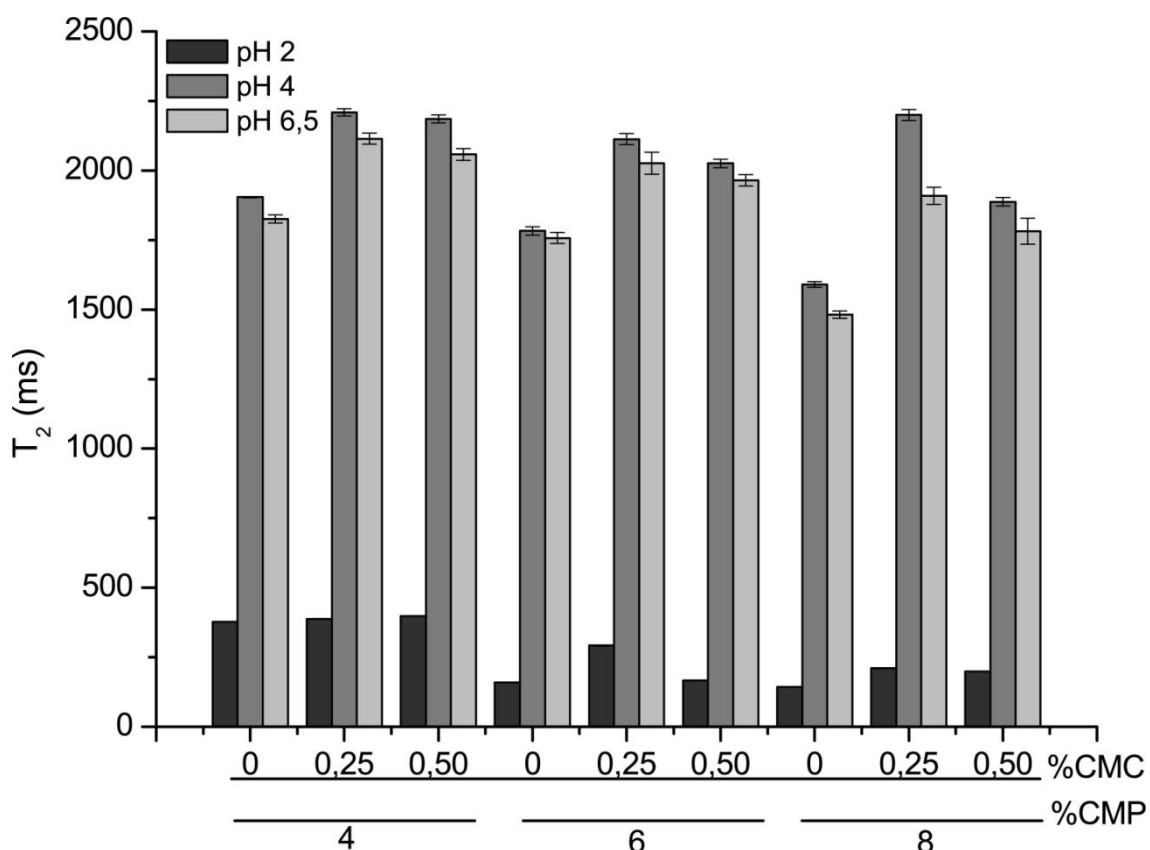


FIGURA 27 – VALORES DE T_2 COMPARATIVOS ENTRE AS AMOSTAS

O aumento de T_2 em pH 4 em relação aos demais pHs ocorreu devido ao CMP estar próximo ao seu ponto isoelétrico, onde as cargas estão nulas, o que indisponibiliza a interação com as moléculas de água. Normalmente, os valores de T_2 são maiores em líquidos do que em sólidos ou semi-sólidos, isto devido à relação com a viscosidade. Quando comparadas as amostras não gelificadas (pH 4 e 6,5) com mesma composição, pode-se perceber que os valores de tempo de relaxação transversal são maiores em pH 4, o que confirma um menor grau de hidratação devido à proximidade ao ponto isoelétrico do CMP.

O aumento na concentração do peptídeo diminui os valores de T_2 nos pHs do estudo, o que demonstra interação do peptídeo com o solvente.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem afirmar que a água interage de diferentes maneiras nas superfícies macromoleculares, sendo essas interações ligeiramente distintas de acordo com o pH. Em pH 2 há compartimentação da água, sendo que a adição de CMC pode restringir ainda mais a sua movimentação, dependendo da concentração do peptídeo. Por outro lado, o polissacarídeo pode ser um agente plastificante em sistemas com concentração de CMP acima de 4%. Em pH 4, a água interage pouco com os demais componentes, devido à proximidade ao ponto isoelétrico do CMP e a uma maior afinidade com CMC. Em pH 6,5 a interação com água parece ser pouco significativa em termos de força de ligação, resultando em maior mobilidade das moléculas na presença do polissacarídeo.

Agradecimentos

Ao professor Edgar Francisco Oliveira de Jesus do Laboratório de Instrumentação Nuclear, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - RJ. À professora Joana Léa Meira Silveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

REFERÊNCIAS

ALTAY, F.; GUNASEKARAN, S. Rheological evaluation of gelatinexanthan gum system with high levels of co-solutes in the rubber-to-glass transition region. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 141-150, 2012.

BERTRAM, H. C.; WIKING, L.; NIELSEN, J. H.; ANDERSEN, H. J. Direct measurement of phase transitions in milk fat during cooling of cream-low field NMR approach. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1056–1063, 2005.

CAPITANI, C.; PÉREZ, O. E.; PACHECO, B. - TERESA, M.; PILOSO, A. M. R. Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p.1344-1354, 2007.

CÈSARO, A.; CUPPO, F.; FABRI, D.; SUSSICH, F. Thermodynamic Behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, v. 388, p. 143-153, 1999.

DELBEN, F.; STEFANCICH, S. Interaction of Food Proteins with Polysaccharides I: properties upon Mixing. **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 325-346, 1997.

DELFOUR, A.; JOLLES, J.; ALAIS, C.; JOLLES, P. Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, p. 452-455, 1965.

DICKINSON, E. **An Introduction to Food Colloids**. Oxford:Oxford Science Publishers. 1992.

DUCKWORTH, R. B. Water Relations in Foods. London: Academic Press, 1975, 716 pp.

FEDDERSEN, R. L.; THORP, S. N. Sodium carboxymethylcellulose. In: **Industrial Gums**. Whistler, R. L., BeMiller, J. N. (Eds.), Academic Press, San Diego, p. 537-578, 1993.

GANZ, A. J. Cellulose hydrocolloids. In: **Food colloids**. Graham H.G. (Ed.), AVI, Westport, CT, USA, 1977.

GIDLEY, M. J. Nuclear magnetic resonance analysis of cereal carbohydrates. In Developments in Carbohydrate Chemistry, Alexander, R. J., Zobel, H. F. (Eds.), pp. 163-191. **American Association of Cereal Chemists**, Saint Paul, Minnesota, 1992.

GLICKSMAN, M. Functional properties of hydrocolloids. In: **Food Hydrocolloids**. v. 1, M. Glicksman (Ed), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1982, p. 47-99.

HANSEN, M. R.; BLENNOW, A.; FARHAT, I.; NØRGAARD, L.; PEDERSEN, S.; ENGELSEN, S. B. Comparative NMR relaxometry of gels of amylomaltase-modified starch and gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2038-2048, 2009.

HILLS, B. P.; TAKACS, S. F.; BELTON, P. S. The effects of proteins on the proton NMR transverse relaxation times of water (part I). **Molecular Physics**, v. 67, pp. 903-918, 1989.

HILLS, B. P.; CANO, C.; BELTON, P. S. Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. **Macromolecules**, v. 24, p. 2944-2950, 1991

HILLS, B. P.; REMIGEREAU, B. NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 51-61, 1997.

HILLS, B. P.: Magnetic resonance imaging in food science. New York: Wiley, 1998, 352 pp.

HINRICHS, R.; GOTZ, J.; WEISSER, H. Water-holding capacity and structure of hydrocolloid-gels, WPC-gels and yoghurts characterized by means of NMR. **Food Chemistry**, v. 82, p. 155-160, 2003

HIRATA, R.; SOUZA, W.J.; PESSOA, L. Carboximetilcelulose na indústria alimentícia uma abordagem técnica. In: **Anais do simpósio sobre hidrocolóides**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 1993.

KELLER, J. D. Sodium carboxymethylcellulose (CMC). **Food Hydrocolloids**. v. 3. Ed. M. Glicksman. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1983, p. 43-109.

KERR, W. L.; WICKER, L. NMR proton relaxation measurements of water associated with high methoxy and low methoxy pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 133-141, 2000.

KOUPANTSIS, T.; KIOSSEOGLOU, V. Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1156-1163, 2009.

LAMSAL, B. P.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 1215-1223, 2007.

MARTINEZ, M. J.; FARÍAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropetide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 869-867, 2011.

MEIBOOM S.; GILL, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Relaxation Times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, p. 688-691, 1958.

PERRECHIL, F. A.; BRAGA, A. L. M.; CUNHA, R. L. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behaviour. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2085-2093, 2009.

SCHMIDT, S. J.; LAI, H. M. Use of NMR and MRI to study water relations in foods. In: Levine, H. - Slade, L. (Ed.): *Water Relationships in Foods: Advances in the 1980s and Trends in the 1990s*. New York: Plenum Press, 1991, pp. 405-452.

SLICHTER, C. P (1990). *Principles of magnetic resonance*. Springer Verlag.

PIYASENA, P.; CHAMBERS, J. Influence of whey protein on syneresis of raw milk curds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 669-675, 2003.

TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: **Functional Properties of Food Macromolecules**. Hill, S. E; Ledward, D. A.; Mitchell, J. R. (Eds), Gaithersburg/Maryland: Aspen Publishers Inc., 1998, p. 252-277.

TONG, Q.; XIAO, Q.; LIM, L. T. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. **Food Research International**, v. 41, p.1007-1014, 2008.

VALIM, M. D.; CAVALLIERI A. L. F.; CUNHA, R. L. Whey protein/arabic gum gels formed by chemical or physical gelation process. **Food Biophysics**, v. 4, p. 23-31, 2009.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 293-303, 2003.

CAPÍTULO 4

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CARBOXIMETILCELULOSE EM GÉIS
ÁCIDOS DE CASEINOMACROPEPTÍDEO: PROPRIEDADES REOLÓGICAS,
ÓTICAS E MICROESTRUTURA**

RESUMO

A influência da adição de carboximetilcelulose (CMC) em géis ácidos de caseinomacropeptídeo (CMP) foi avaliada usando diferentes técnicas: reologia dinâmica, opacidade, tempo de gelificação, força de ruptura, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e capacidade de retenção de água. Os resultados demonstram separação de fases em concentrações maiores que 4% de CMP, confirmada pelas imagens da microestrutura. Essa incompatibilidade ocasionou uma diminuição na força dos géis, porém nas amostras sem separação de fases há uma interação positiva entre o polissacarídeo e o peptídeo. A opacidade aumentou na presença do hidrocolóide.

4.1 INTRODUÇÃO

O caseinomacropéptido (CMP) é um péptido terminal composto por 64 aminoácidos resultantes da clivagem da κ -caseína na ligação Phe105-Met106 no processo fabril do queijo com o uso de quimosina. O CMP é liberado no soro, enquanto o restante da κ -caseína precipitada na massa (DELFOUR et al., 1965). Possui duas variantes genéticas A e B; e modificações translacionais, glicosilação e fosforilação. A forma glicosilada (gCMP) representa 50% do CMP total e contém a totalidade dos carboidratos presentes na κ -caseína, sendo o carboidrato predominante o ácido siálico (COOLBEAR; ELGAR; AYERS, 1996; MOLLÉ; LEONIL, 2005).

Embora o CMP possua propriedades tecnológicas interessantes, como capacidade emulsificante e estabilização de emulsões, formação de gel e espuma, entre outras (BURTON; SKUDDER, 1987; CHOBERT et al., 1989; MARSHALL, 1991; AHMED; RAMASWAMY, 2003; MARTÍN DIANA; FRÍAS; FONTECHA, 2005), a adição de polissacarídeos em sistemas contendo proteínas com intuito de melhorar essas propriedades é comum na indústria de alimentos.

No entanto, esses sistemas podem apresentar diferentes graus de compatibilidade dependendo de fatores como pH, força iônica, temperatura, concentração ou cisalhamento a que são submetidos (DICKINSON, 1992; DELBEN; STEFANCICH, 1997; CÈSARO et al., 1999). Podendo ocorrer separação de fases associativa ou segregativa, neste último caso devido à incompatibilidade termodinâmica. Não é raro ocorrer tal fenômeno, principalmente em condições onde a proteína está carregada negativamente, na presença de um polissacarídeo neutro ou aniônico (DOUBLIER et al., 2000). Em pH próximo ao ponto isoelétrico, a agregação da proteína resulta na formação de uma estrutura de gel, o que reduz a mobilidade dos ingredientes (TROMP; RENNIE; JONES, 1995).

O objetivo nesse capítulo foi avaliar o efeito da adição de CMC nas propriedades reológicas, óticas e microestrutura de sistemas ácidos gelificados em pH 2 de CMP.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

Os ensaios foram realizados utilizando: (i) BioPURE-GMP® casein glycomacropeptide (CMP) provido por DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA). A composição do CMP foi de: proteína (base seca) 82,5% (m/m) (N x 6,47), sendo CMP 90,0% (m/m) (N x 7,07) da proteína total, 0,5% (m/m) gordura, 6,0% (m/m) cinzas e umidade. (ii) carboximetilcelulose (30 FGH – 70520, com alto grau de substituição e alta viscosidade) fornecido pela International Speciality Products – Brasil.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparo das amostras

Soluções estoques de CMP (16%) e CMC (1%) foram preparadas em água purificada Milli-Q e mantidas sob refrigeração até a completa dissolução dos componentes. Posteriormente, estas foram adequadamente misturadas para obter as concentrações necessárias de CMP (4, 6 e 8%) e CMC (0, 0,25 e 0,5%) nos sistemas. O pH (2) foi ajustado com HCl e NaOH 1N. Os géis foram designados como G1 (4% de CMP e 0% de CMC), G2 (4% de CMP e 0,25% de CMC), G3 (4% de CMP e 0,5% de CMC), G4(6% de CMP e 0% de CMC), G5 (6% de CMP e 0,25% de CMC), G6 (6% de CMP e 0,5% de CMC), G7 (8% de CMP e 0% de CMC), G8 (8% de CMP e 0,25% de CMC) e G9 (8% de CMP e 0,5% de CMC).

4.2.2.2 Transição sol-gel

O tempo de transição sol-gel foi determinado por modificação da metodologia de Relkin et al. (1998) descrita por Martinez, Farías e Pilosof (2011). Após o preparo amostras foram armazenadas em tubos hermeticamente fechados contendo 2 mL e observadas ao longo do tempo (min) em temperatura constante de 25°C. O tempo de gelificação (t_{til}) foi

definido quando sob inclinação as amostras não deformavam o menisco e a taxa de gelificação (V_{til}) foi calculada como $1/t_{til}$.

Para cada amostra foram realizadas 4 repetições e para cada repetição 3 replicatas, sendo o valor médio das amostras considerado e o erro padrão calculado.

4.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os géis (5 mm x 5 mm x 3 mm) foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 24 h. Após a fixação, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido e realizaram-se duas lavagens de 20 minutos cada com tampão cacodilato de sódio. As amostras fixadas e fraturadas foram desidratadas com soluções de etanol (20%, 40%, 60%, 70% e 90%); por último foram realizadas três lavagens com etanol absoluto. A secagem no ponto crítico foi realizada com CO₂ líquido. As amostras secas foram montadas em “stubs” de alumínio, cobertas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (Laboratório de Microscopia Eletrônica – UFPR).

4.2.2.4 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade do gel de reter água, lipídios, açúcares e outros componentes é muito importante no desenvolvimento de novos produtos, como salsichas, produtos de panificação e sistemas gelificados. Considera-se como água retida a soma da água ligada, livre e fisicamente retida no gel (PUPPO; LUPANO; AÑÓN, 1995; DAMODARAN, 1996).

Amostras em triplicata na forma de disco (1,5 - 2 g) foram divididas em duas partes, posteriormente cada parte foi envolvida em papel de filtro (Whatman nº 1) antes de serem colocadas em tubos de centrifuga de capacidade de 50 mL (IKEDA; FOEGENDING, 1999). A quantidade de água liberada foi determinada gravimetricamente após centrifugação (246 g/5 min) em centrifuga MTD III Plus (Logen Scientific, Brazil), sendo a CRA expressa em porcentagem de água retida (equação 18):

$$\% \text{ CRA} = 100 \left[1 - \left(\frac{\text{água liberada (g)}}{\text{água gel (g)}} \right) \right] \quad (18)$$

onde:

água liberada = quantidade de água retida no papel de filtro

água gel = quantidade inicial de água na amostra.

4.2.2.5 Medidas reológicas

Haake Mars Rheometer (Karlsruhe, Germany), com software Haake Rheowin 1.3, operando com rotor P20 Ti L (20,006 mm), em sistema de placas paralelas (gap = 1 mm), foi utilizado nas análises oscilatórias. A temperatura de 25°C foi mantida por UTMTC - Universal Temperature Module Controller (Karlsruhe, Germany). Inicialmente, foram realizadas varreduras de tensão para a determinação do intervalo de viscoelasticidade linear nas frequências de 0,05; 0,1 e 1 Hz. Com uma tensão de 2 Pa, varreduras de frequência de 0,1 a 10 Hz foram efetuadas para a obtenção do espectro mecânico. O comportamento dos módulos de armazenamento (G') e dissipação (G''), assim como os valores para o ângulo de fase ($\tan \delta = G''/G'$), foram avaliados em função da frequência. Na composição dos espectros mecânicos foram utilizadas as médias das amostras em triplicata e o erro padrão calculado.

4.2.2.6 Força de ruptura do gel

A força dos géis (3 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura) equilibrados a 25°C foi determinada em texturômetro LFRA Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc. USA), operando com probe cilíndrico de acrílico de 1,27 cm de diâmetro, a uma força de compressão de 10 gf e 50% de compressão. A força máxima (em gramas) foi registrada como a compressão do probe na amostra a velocidade de teste de 2 mm/s e a força de ruptura foi calculada (Yan et al., 2010) (equação 19):

$$\sigma = \frac{F \times 9,81}{\pi \times r^2} \text{ (N/mm}^2\text{)}$$
(19)

onde:

σ , F, r representam força de ruptura, força máxima e raio do probe, respectivamente. Para cada amostra foram realizadas cinco repetições.

4.2.2.7 Grau de opacidade

Na determinação do grau de opacidade, 15 mL de cada amostra foram preparados em sextuplicata e transferidos para placas de Petri (6 cm de diâmetro). Após a formação dos géis, foram equilibrados a 25°C e avaliados em colorímetro MiniScan XE Plus (Hunter Associates Laboratory, Inc. Reston, Virginia, USA). O equipamento foi calibrado com um fundo padrão branco e preto e o grau de opacidade obtido de acordo com a equação 20:

$$Op = \frac{Opn}{Opb} \times 100$$
(20)

Em que:

Op = opacidade do gel (%)

Opn = opacidade do gel sobreposto a um fundo negro

Opb = opacidade do gel sobreposto a um fundo branco

4.2.2.8 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância e teste de média de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do software Statistica 7.1 (STATSOFT, Michigan, USA) e os gráficos obtidos pelo programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da adição de CMC no tempo de gelificação dos sistemas

As médias obtidas nos ensaios para o tempo de gelificação (t_{gel}) em minutos dos géis foram: G1 – 2524, G2 - 2840, G3 - 2760, G4 - 890, G5 - 813, G6 - 832, G7 - 318, G8 - 264, G9 - 252.

A presença do polissacarídeo interferiu na taxa de gelificação (V_{gel}), como mostra a Figura 28. Nas amostras com 4% de CMP, G1 (sem adição de CMC) apresenta um valor maior para V_{gel} em comparação com G2 (com 0,25% de CMC) e G3 (com 0,5% de CMC). Tal fato pode ser facilmente explicado, uma vez que géis de CMP são formados em duas etapas. Na primeira há interações hidrofóbicas entre monômeros do peptídeo resultando em dímeros, em um segundo momento esses dímeros positiva e negativamente carregados interagem formando a rede de gel (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011). Justamente nesse segundo momento o polissacarídeo compete por regiões positivamente carregadas nos dímeros de CMP. Como a concentração do peptídeo é baixa, os dímeros estão suficientemente afastados, o que é reforçado por um tempo de gelificação mais elevado nessas amostras (G1 a G3). Além disso, na presença de CMC, a viscosidade do sistema aumenta dificultando ainda mais a aproximação. Essa sequência de fatos favorece a interação de CMC com os dímeros de CMP em G2 e G3, o que dificulta a formação da rede de gel.

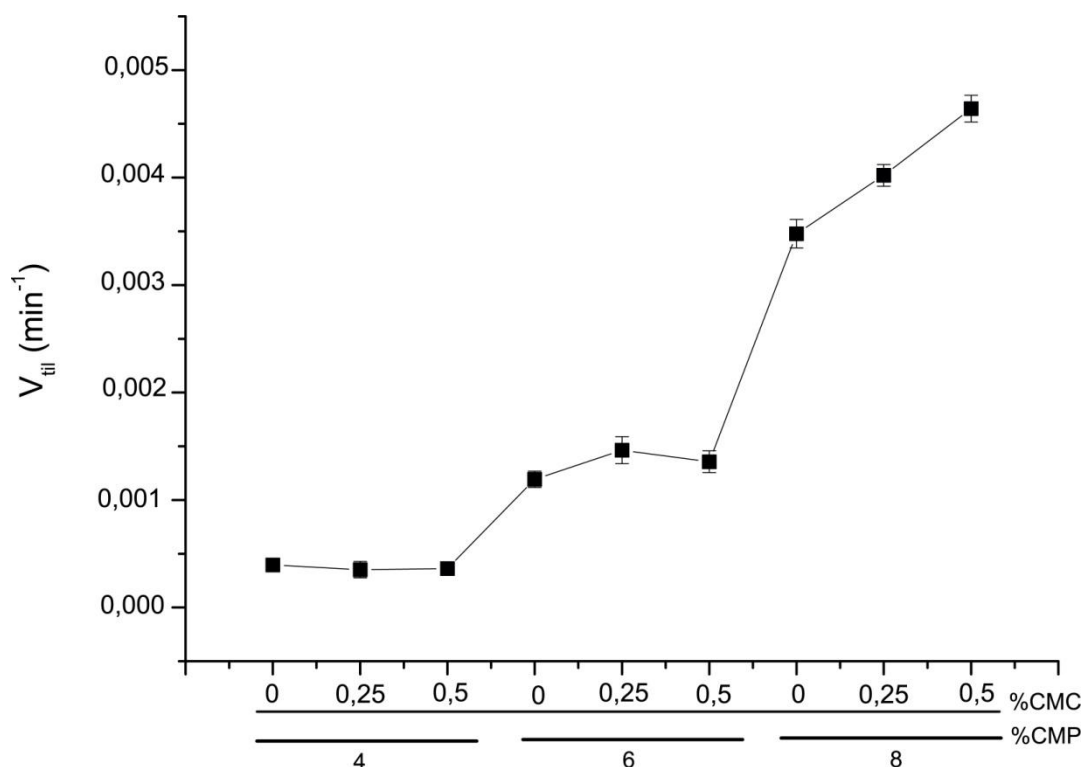


FIGURA 28 - TAXA DE GELIFICAÇÃO (V_{GEL}) PARA OS SISTEMAS A 25°C. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO (N=12).

Nas amostras com 6% de CMP, a presença do polissacarídeo interfere de maneira positiva em V_{til} . G5 e G6 (0,25 e 0,5% de CMC) apresentam maiores valores que G4 (sem CMC), o mesmo ocorre nas amostras com 8% de CMP, onde G8 e G9, também com 0,25 e 0,50% de CMC, apresentaram valores mais acentuados que G7. Esses resultados são intrigantes, uma vez que CMC não participa da formação da rede principal, e nas condições do estudo não é capaz de formar gel. Isso nos permite especular uma possível separação de fases nessas concentrações, 6 e 8% de CMP, mesmo que microscopicamente. Nos resultados do capítulo 3 não se percebe separação de fases macroscópica nos sistemas contendo CMP (2 a 10%) e CMC (0 a 0,5%) em pH 2, mas os dados de espectrofotometria sugerem tal fato, assim como outros resultados no capítulo atual (MEV e medidas reológicas). Portanto, em razão da incompatibilidade termodinâmica dos componentes nesses sistemas, o peptídeo é obrigado a se organizar de forma mais ordenada e compacta na presença de CMC, a fim de evitar contato, favorecendo a formação mais rápida da rede de gel.

Existe ainda outro trabalho desenvolvido por Kasapis et al. (1993) que reforça o que já foi discutido. Esses autores perceberam que em concentrações

fixas de gelatina e crescentes de maltodextrina (SA-6) o tempo para formar uma rede auto-sustentável inicialmente decresce com o aumento na concentração de SA-6, na sequência há um aumento para finalmente decrescer mais uma vez. Esse comportamento segundo os autores é resultado inclusive do fenômeno de exclusão do polímero.

Outro fato interessante é o aumento ainda mais significativo de V_{til} com a elevação na concentração do peptídeo. Comparando-se as amostras com mesma concentração de CMC, mas com 4, 6 e 8% de CMP, percebe-se que o peptídeo tem maior influência sobre a taxa de gelificação que o polissacarídeo.

4.3.2 Microestrutura dos géis

As amostras G1 e G2 não resistiram ao preparo para observação no microscópio, devido à sua frágil estrutura. Alternativamente tentou-se outra metodologia, a do preparo de xerogéis com liofilização, mas também não se obteve boas imagens, pois a estrutura ficou comprometida. Portanto, não foi possível avaliar a microestrutura desses géis.

A Figura 29 mostra a microestrutura dos sistemas adicionados ou não de CMC. Percebe-se que em G3 há uma única rede, não evidenciando separação de fases. Mas nas amostras com 6 e 8% de CMP, as imagens revelam duas redes distintas (MORRIS, 1986) na presença do polissacarídeo. Tais resultados indicam uma separação de fases nos géis com concentração superior a 4% de CMP, embora não seja perceptível macroscopicamente, o que é totalmente possível. Essa separação ocorre ainda na fase sol formando uma emulsão água em água nas dispersões.

Conforme trabalho desenvolvido por Perrechil, Braga e Cunha (2009), não houve separação de fases macroscópica, mas sim microscópica em alguns géis de caseinato de sódio e goma locusta. O que foi atribuído à concentração dos componentes, que por estar acima da curva binodal favoreceu a incompatibilidade termodinâmica, mas como o processo de gelificação ocorreu mais rápido do que a separação de fases formou-se uma estrutura de rede de proteína contínua com inclusões do polissacarídeo pouco dispersas.

Nos géis G5, G6, G8 e G9, a rede principal ou fase contínua é constituída por blocos de CMP, que se associam formando grandes

aglomerados. O polissacarídeo compõe a rede secundária, organizada entre os interstícios da rede principal. Isso porque o arranjo tridimensional da rede ocorre rapidamente, devido à proximidade dos dímeros do peptídeo, obrigando uma reorganização das cadeias de CMC que vão sendo aprisionadas nos espaços restantes. Embora a separação de fases não seja uma característica desejável em muitos sistemas alimentícios, géis com a microestrutura obtida podem ser uma oportunidade de desenvolvimento de produtos com propriedades de textura diferenciada.

Outra característica interessante é que com o aumento da concentração de CMP, a estrutura do gel mostra-se mais homogênea e sólida. Essa mudança na estrutura resulta certamente em um aumento na força dos géis, visualizado nos resultados de força de ruptura.

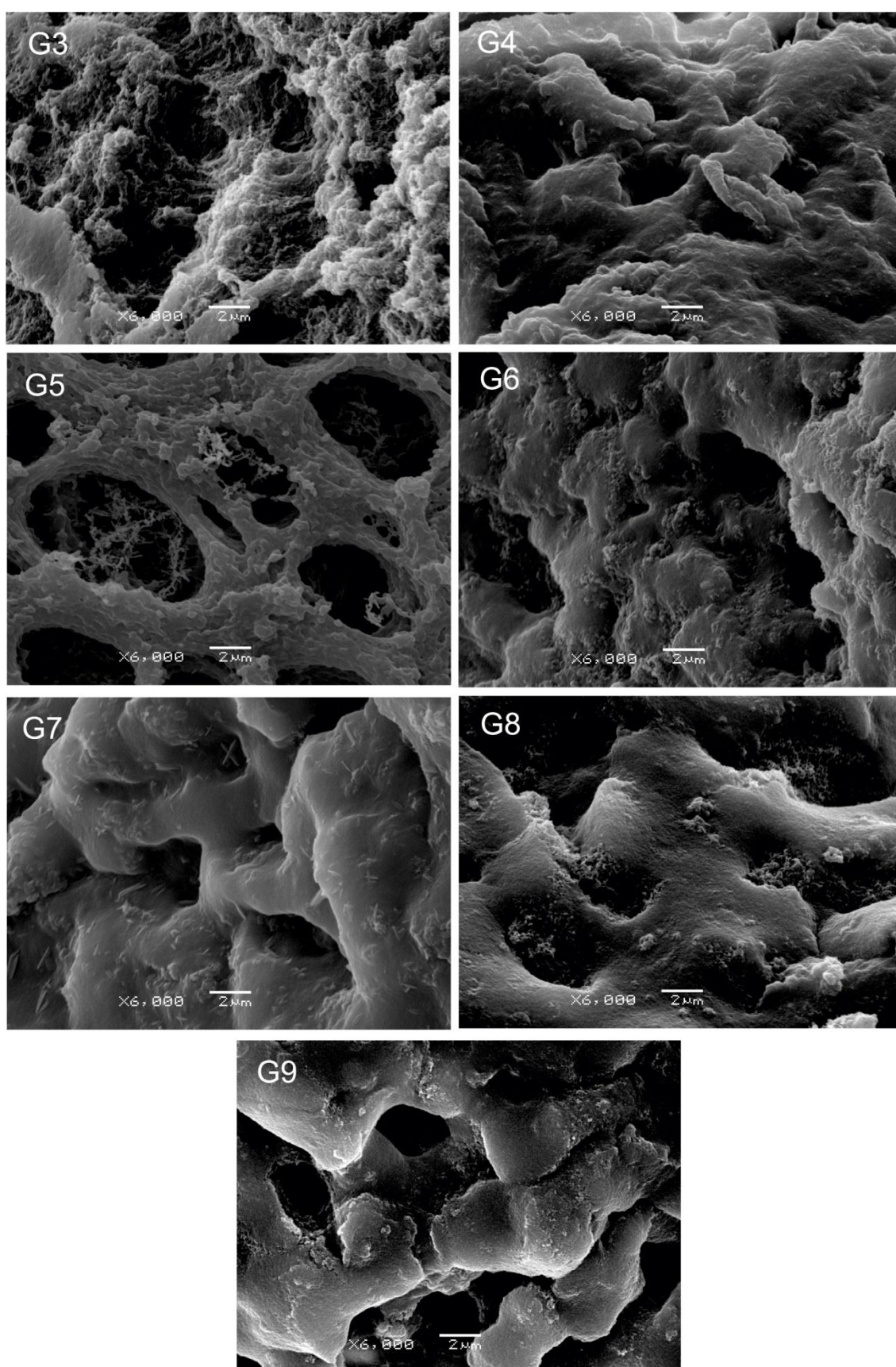


FIGURA 29 - MICROESTRUTURA DAS AMOSTRAS G3 A G9 (6000X DE AUMENTO)

4.3.3 Capacidade de retenção de água dos géis

A capacidade de reter água de géis em sua rede tridimensional é um indicativo da força das interações, pois géis fracos tendem a perder mais água, consequentemente são formados por interações fracas. As amostras apresentaram valores inferiores a 80%, o que pode caracterizar esses géis como fracos.

Os sistemas apresentaram melhora na capacidade de retenção de água com adição de CMC, mas isso apenas para a concentração de 4% de CMP, nas demais amostras, embora não haja diferença estatística, os géis adicionados de CMC perderam mais água (Figura 30).

Uma explicação lógica para o ocorrido é que a rede formada à baixa concentração de CMP (4%) é muito fraca. Quando o polissacarídeo (carga negativa) é adicionado há uma associação com o peptídeo (carga positiva), que resulta em uma maior retenção de água. Isso porque a CMC permanece na parte interna da rede ou na superfície desta, ligado por interações eletrostáticas (VAN DEN BERG et al., 2007), tornando a rede mais elástica.

Em concentração mais elevada de CMP (6 e 8%), inicia-se a separação de fases, conforme discutido anteriormente. Por esse motivo, o polissacarídeo não está associado ao peptídeo, mas apenas aprisionado mecanicamente nos interstícios da rede do gel, sendo facilmente liberado junto com a água sob centrifugação, o que justifica uma maior perda de massa nas amostras G5 e G6 em comparação à G4 (sem CMC), como também G8 e G9 em relação à G7 (sem CMC).

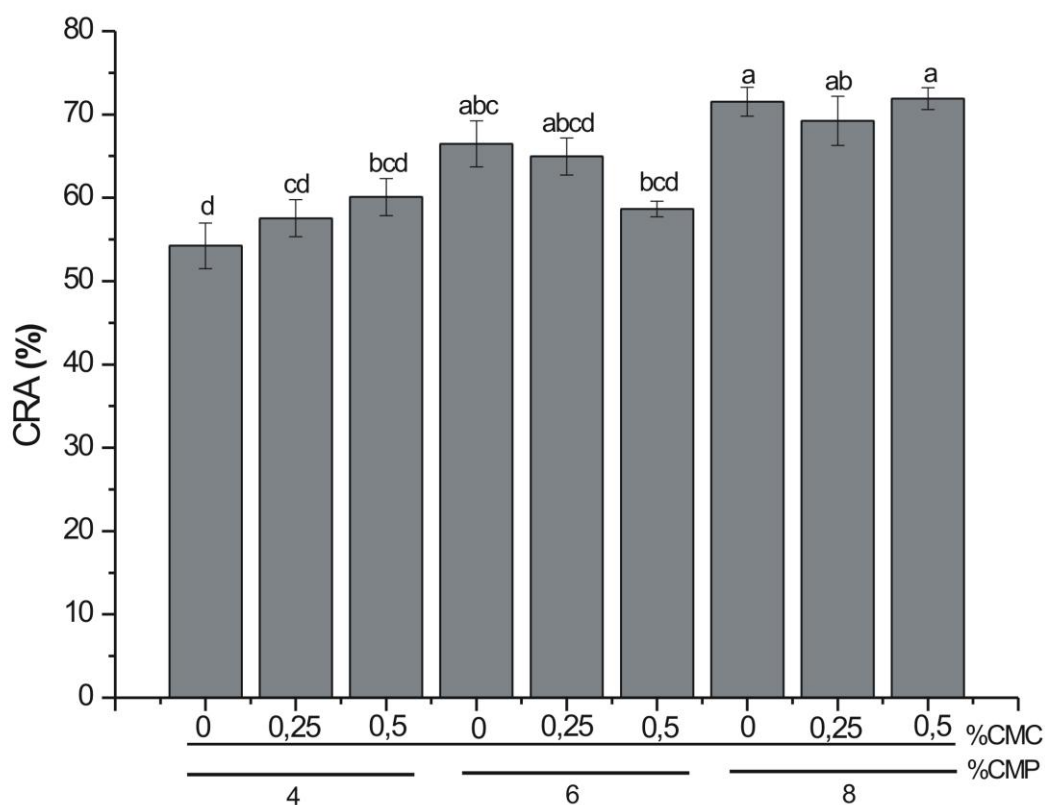


FIGURA 30 - MUDANÇA NA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA DAS AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE CMC

4.3.4 Influência da adição de CMC na viscoelasticidade dos géis de CMP

O módulo de armazenamento (G') está relacionado com as propriedades elásticas e o módulo de dissipação (G'') com as propriedades viscosas. O material em análise só pode ser classificado como gel quando os valores de G' são maiores que G'' (STEFFE, 1996). G' e G'' plotados em razão da frequência fornecem informações importantes a respeito da estrutura do gel, sendo essa relação designada como espectro mecânico ou varredura de frequência e pode ser usada para determinar a diferença entre redes emaranhadas, materiais covalentemente reticulados e géis físicos (CLARK; ROSS-MURPHY, 1987)

Os parâmetros reológicos de géis formados por interações físicas são pouco dependentes da frequência, sendo o grau de dependência determinado pela constante n , obtida pela relação proposta por Egelandtsdal, Fretheim e Harbitz (1986):

$$\log G' = n \log f + k \quad (21)$$

Para G' : módulo de armazenamento, f : frequência de oscilação e k : uma constante. A constante n é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular de um gráfico log-log de G' versus f .

Sabendo que em um gel físico $n > 0$ e para géis formados por ligações covalentes $n=0$, conforme proposto por Clark e Ross-Murphy (1987), esse parâmetro foi usado para classificar os géis analisados.

De acordo com os valores de n (Figuras 31, 32 e 33), todos os géis classificam-se como físicos, o que era previsto, uma vez que a auto-associação do peptídeo na formação da rede do gel envolve interações puramente físicas, como hidrofóbicas e eletrostáticas (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011).

Doucet, Gauthier e Foegeding (2001) avaliaram as características reológicas de géis de WPI (isolado proteico de soro de leite) após hidrólise enzimática e obtiveram valores de $n > 0$. Resultados similares foram obtidos por Stading e Hermansson (1990) quando determinaram a constante n como uma função do pH (2,5 - 9) para géis térmicos de β -lactoglobulina. Em ambos os trabalhos, os géis também foram classificados como físicos.

De acordo com a Figura 31, G3 obteve valores mais altos para G' , o que sugere um maior sinergismo entre CMP-CMC na concentração de 4% e 0,5%, no entanto com o aumento da frequência, acima de 1 Hz, G'' aumenta significativamente, assim como o valor de $\tan \delta$. O aumento nos valores do módulo de armazenamento está associado com a formação de uma estrutura mais densa em G3. Nessa amostra ocorreu também um aumento nos valores de n (0,08) em comparação com G1 e G2 (0,06).

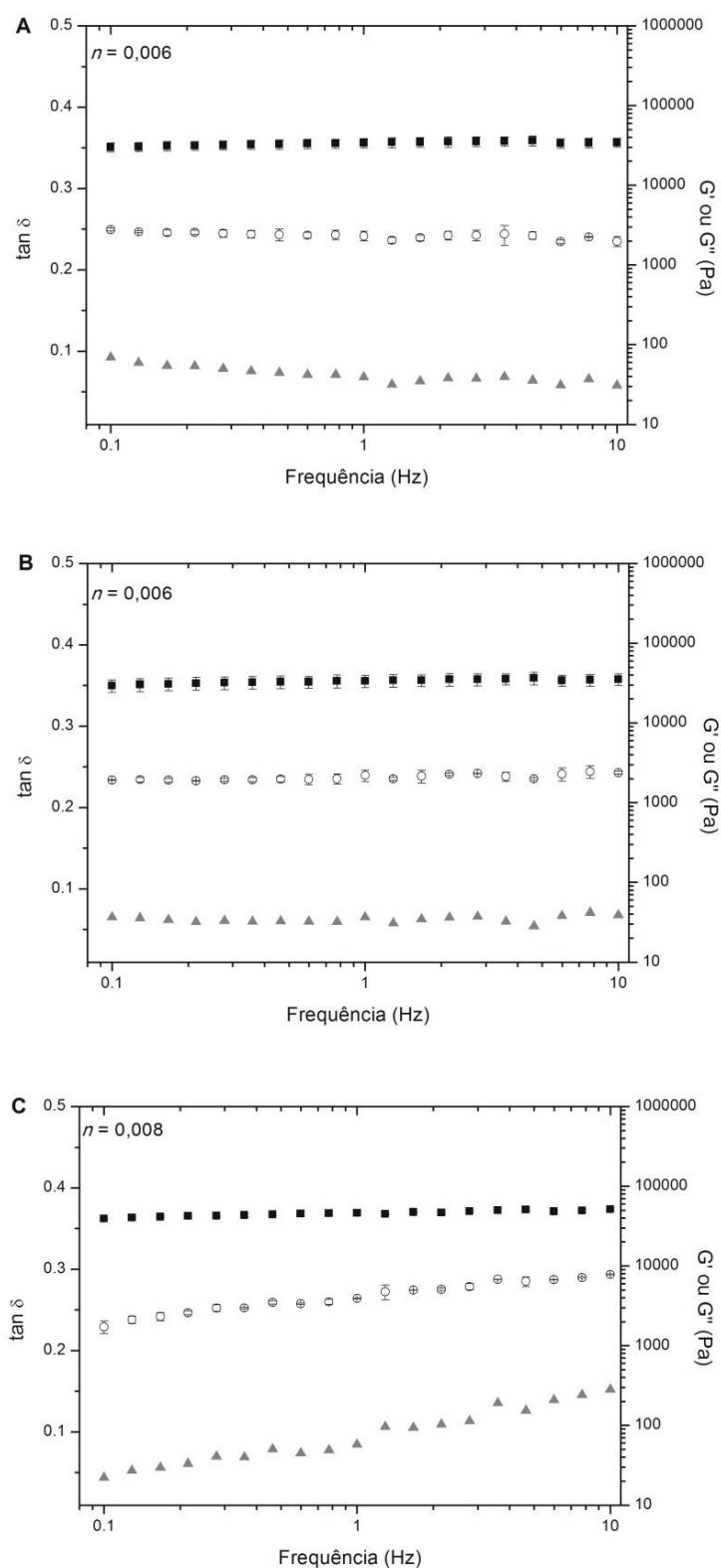


FIGURA 31 - INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CMC NOS ESPECTROS MECÂNICOS DE GÉIS COM 4% CMP, SENDO G1 COM 0% (A), G2 COM 0,25% (B) E G3 COM 0,50% DE CMC (C). MÓDULO ELÁSTICO (G') (■), MÓDULO VISCOSO (G'') (○) E TAN δ (▲). BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO

Na Figura 32 estão representados os gráficos referentes a G4, G5 e G6. Os valores de G' mostraram-se maiores para G4, seguido de G6 e G5. Da mesma forma que para as amostras anteriores, o aumento da frequência revela um aumento de G'' e consequentemente $\tan \delta$, nos géis com CMC. Em G7, G8 e G9 (Figura 33) novamente CMC contribuiu para formação de géis mais fracos, o que pode ser confirmado por valores menores de G' na presença do polissacarídeo e também, aumento gradual de G'' e $\tan \delta$ com aumento da frequência. Os valores de n também foram maiores nesses géis com polissacarídeo. De acordo com Rocha et al. (2009), uma maior dependência de $\tan \delta$ em relação à frequência, bem como o aumento nos valores de n sugerem um caráter mais viscoso nas amostras. Esses autores também correlacionam o aumento no “*slope*” com uma maior importância das ligações não-covalentes. No entanto, pode-se supor que esse aumento no parâmetro n deve-se a interação do polissacarídeo com a água, uma vez que não há aumento de G' para esses géis.

Clark et al. (1983) estudaram a adição de gelatina em sistema gelificados de agarose o que ocasionou uma diminuição inesperada no módulo de elasticidade. Em outro estudo, Nilsson e Muhrbeck (1992) adicionaram um polímero não-gelificante (poliestireno sulfonado - PSS) em sistemas com carragena e perceberam que em concentrações altas de PSS ocorria a separação de fases, o que resultava em géis mais fracos em comparação com os sistemas puros de carragena.

Esses resultados nos permitem dizer que a rede do gel é organizada exclusivamente por blocos de CMP. Nos poros dessa rede está o polissacarídeo aprisionado na forma de novelos aleatórios, conforme discutido por Morris (1991). Esse preenchimento não gelificado faz o papel de rede viscosa o que diminui a força do gel. No entanto, nos géis G1 a G3 (4% de CMP) há um aumento nos valores de G' na presença de CMC, o que sugere a existência de uma significativa interação associativa.

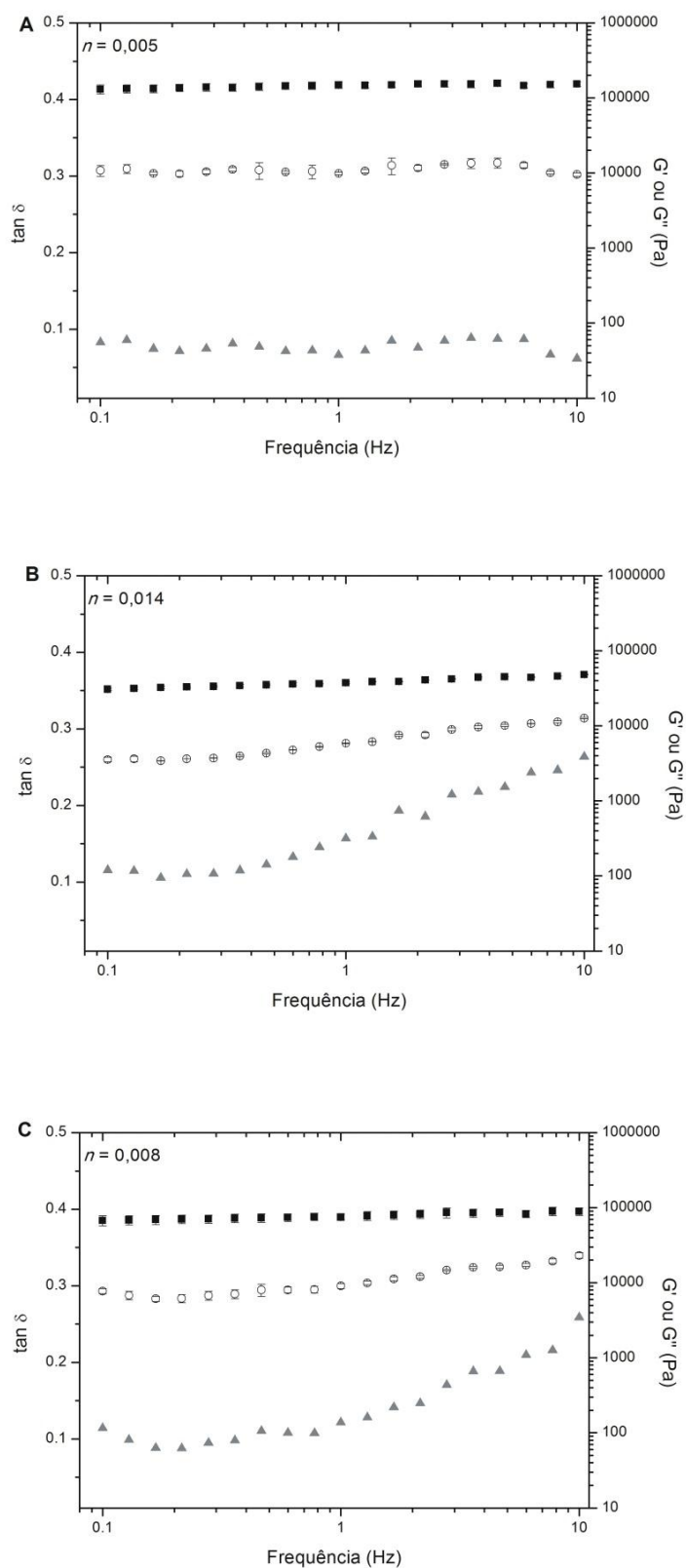


FIGURA 32 - INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CMC NOS ESPECTROS MECÂNICOS DE GÉIS COM 6% CMP, SENDO G4 COM 0% (A), G5 COM 0,25% (B) E G6 COM 0,50% DE CMC (C). MÓDULO ELÁSTICO (G') (■), MÓDULO VISCOSO (G'') (○) E TAN δ (▲). BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO

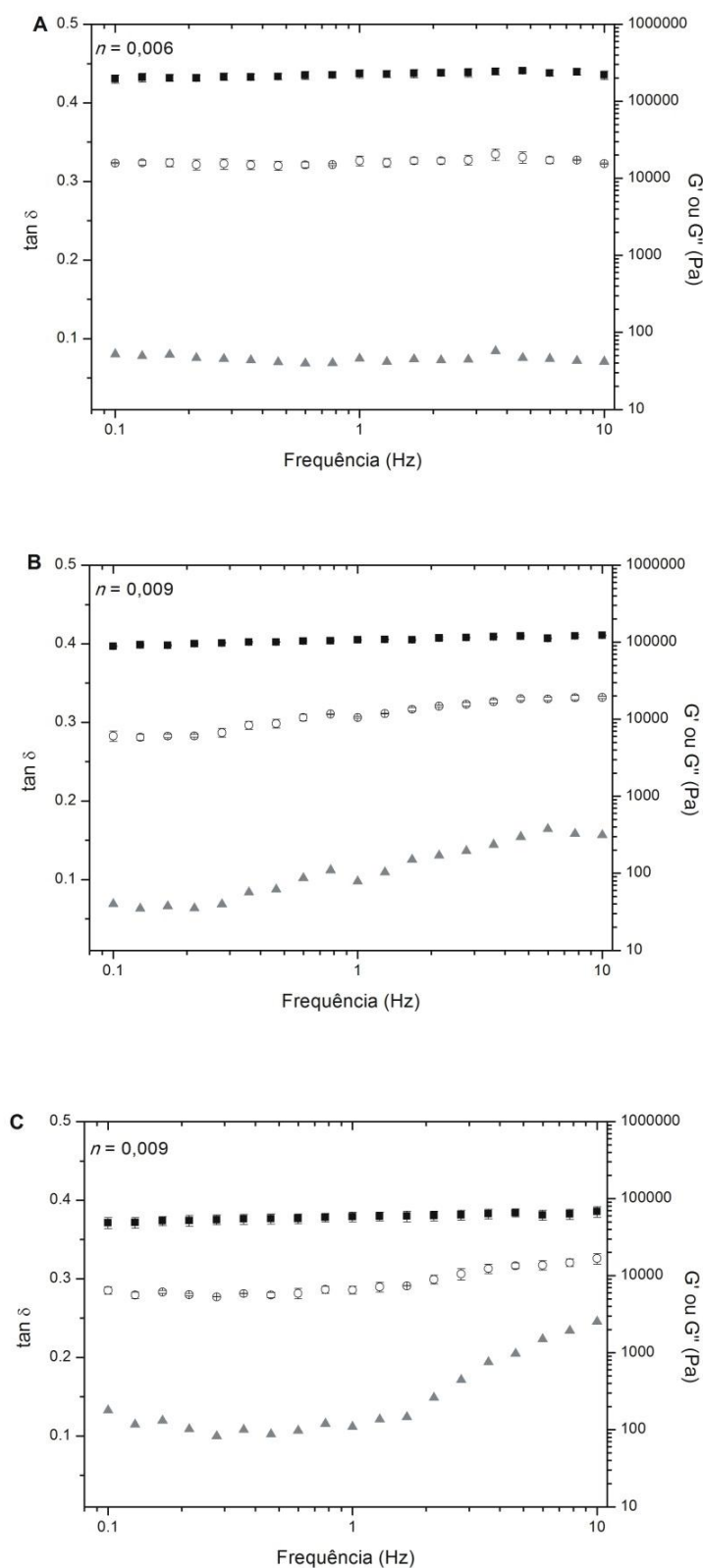


FIGURA 33 - INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CMC NOS ESPECTROS MECÂNICOS DE GÉIS COM 8% CMP, SENDO G7 COM 0% (A), G8 COM 0,25% (B) E G9 COM 0,50% DE CMC (C). MÓDULO ELÁSTICO (G') (■), MÓDULO VISCOSO (G'') (○) E $\tan \delta$ (▲). BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO

4.3.5 Força de ruptura e opacidade dos géis

Interessante notar que todos os géis mostraram-se com estrutura fraca, mesmo G7 que ofereceu maior resistência ($0,01763 \text{ N/mm}^2$) (Figura 34). Esses resultados demonstram uma rede fraca, isso devido à baixa intensidade das interações eletrostáticas entre os dímeros de CMP em pH abaixo de 3,5 (MARTINEZ; FARÍAS; PILOSOFF, 2011).

Nos géis G1 a G3 a presença de CMC ocasionou o aumento da força necessária para a ruptura da rede do gel, mas em concentrações maiores de CMP (6 e 8%) ocorreu efeito contrário, o que confirma a separação de fases nas amostras G5, G6, G8 e G9.

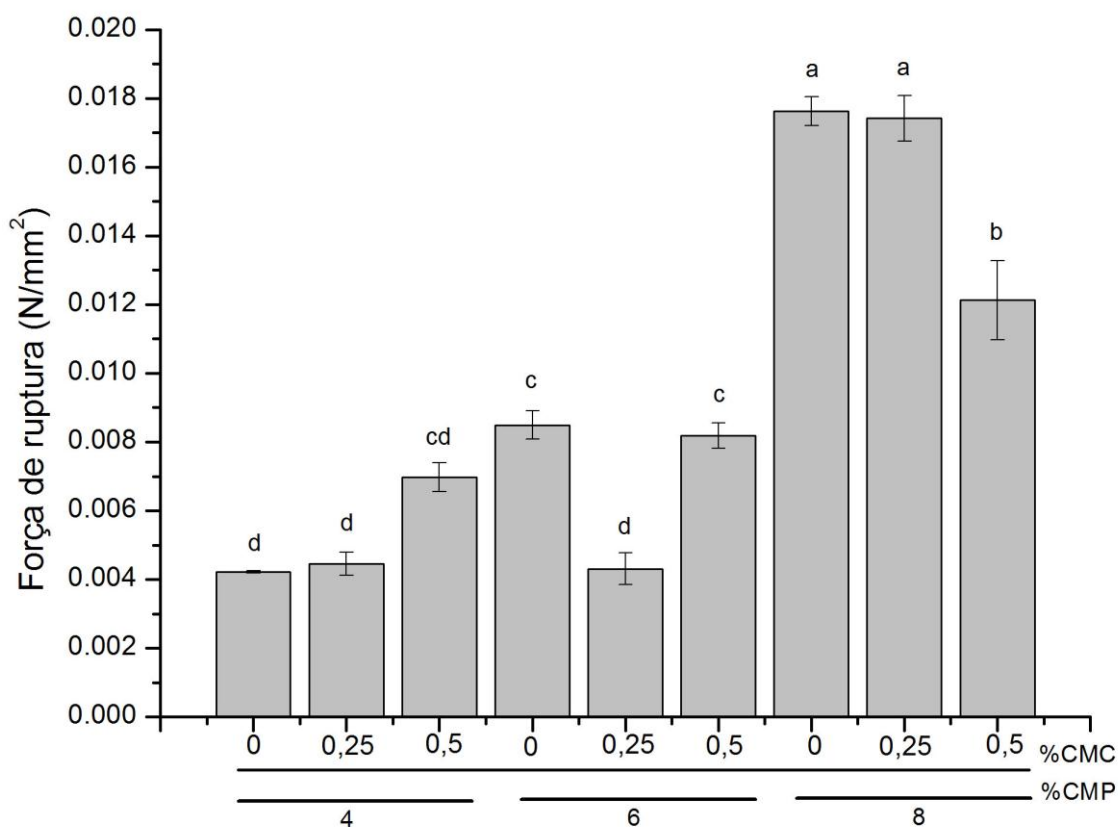


FIGURA 34 - FORÇA DE RUPTURA DOS GÉIS COM E SEM CMC. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO

A transparência é um atributo importante na qualidade de géis em alimentos, embora possa ser visualmente avaliada, medidas exatas são necessárias para entender a influência dos componentes nessa característica. De acordo com os resultados obtidos as amostras são consideradas opacas, pois se obteve valores entre 8 e 15%. O aumento na concentração de CMP ocasionou um aumento na opacidade dos géis sem CMC (G1 $8,35 \pm 0,08$, G4 $11,45 \pm 0,16$, G7 $12,07 \pm 0,37$), isso ocorreu devido à redução na distância entre as cadeias de CMP no estado sol, o que aumentou a possibilidade de agregação e formação de zonas de junção (IKEDA; FOEGEDING, 1999). Em sistemas contendo hidrocolóides, o aumento na concentração também resultou em maiores valores para opacidade (BANERJEE; BHATTACHARYA, 2011)

Na Figura 35 é possível entender as mudanças ocasionadas pela adição de CMC nos géis proteicos. A opacidade aumentou na presença do hidrocolóide, sendo mais opacas as amostras com 0,50% seguidas das com 0,25% de CMC. Essa maior opacidade é explicada pela densidade das redes formadas, que aumenta com a presença do polissacarídeo, esse emaranhado mais denso dificulta a passagem da luz através dos géis.

Adição de um polissacarídeo (goma xantana) também influenciou a opacidade de géis de proteína isolada de soro de leite (desnaturado em temperatura de 80°C) obtidos com adição de 200 mM de NaCl, resultando num aumento desse parâmetro (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000).

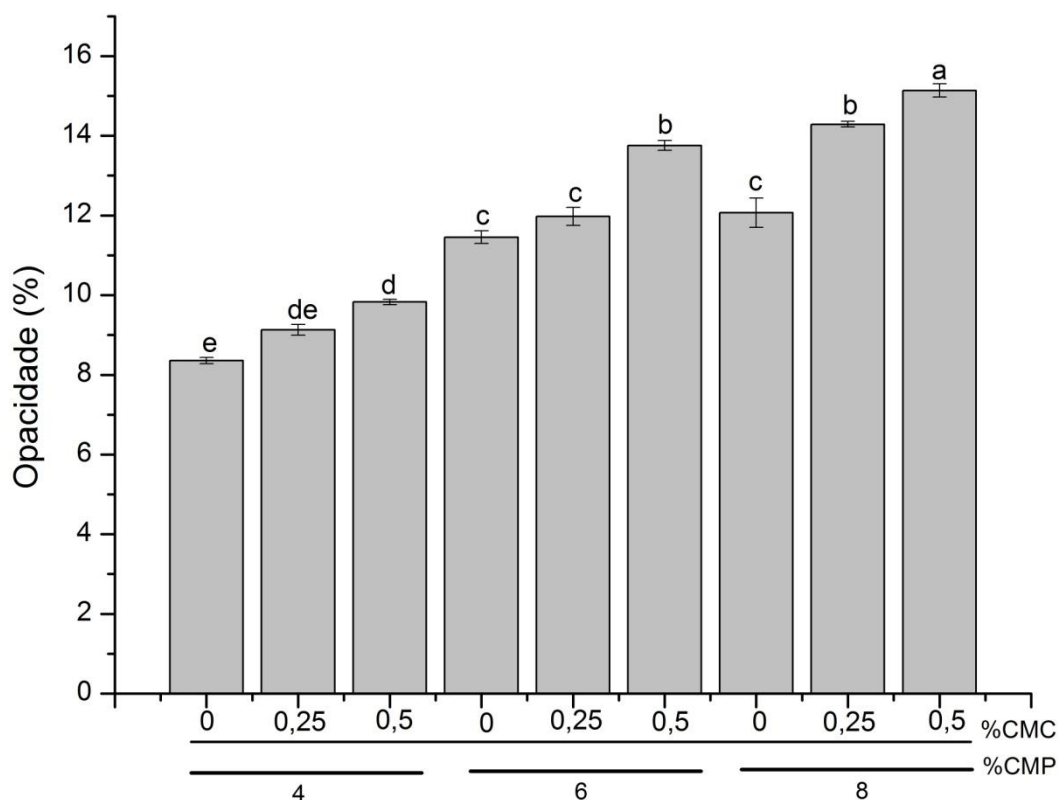


FIGURA 35 - AUMENTO DA OPACIDADE DOS GÉIS NA PRESENÇA DE CMC. BARRA DE ERRO: ERRO PADRÃO

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram uma separação de fases microscópica nos géis em concentração de CMP maiores que 4%. A presença de CMC resultou em uma maior taxa de gelificação nesses géis, também houve um aumento na opacidade das amostras. Os géis que apresentaram separação de fases mostraram uma estrutura mais frágil de acordo com os dados reológicos e de força de ruptura, houve inclusive uma queda na capacidade de reter água dessas amostras. No entanto, nas amostras sem separação de fases, o polissacarídeo parece contribuir para melhora dessas propriedades.

Agradecimentos

Ao colega de trabalho Deonir Agostin, hoje técnico do Laboratório de Microscopia da UFPR e à professora Rosiane Lopes Cunha da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1535-1540, 2003.
- BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Compressive textural attributes, opacity and syneresis of gels prepared from gellan, agar and their mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 287-292, 2011.
- BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D. J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 383-390, 2000.
- BURTON, J.; SKUDDER, P. J. Whey proteins. UK Patent Application GB 2188526 A1. 1987.
- CÈSARO, A.; CUPPO, F.; FABRI, D.; SUSSICH, F. Thermodynamic Behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, v. 388, p. 143-153, 1999.
- CHOBERT, J. M.; TOUATI, A.; BERTRANDHARB, C.; DALGALARRONDO, M.; NICOLAS, M. G. Solubility and emulsifying properties of k-casein and its caseinomacropeptide. **Journal of Food Biochemistry**, v. 13, p. 457-473, 1989.
- CLARK, A. H.; RICHARDSON, R. K.; ROSS-MURPHY, S. B.; STUBBS, J. M. Structural and mechanical properties of agar/ gelatin co-gels. Small deformation studies. **Macromolecules**, v. 16, p. 1367-1374, 1983.
- CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: Clark A. H., Kamide K., Ross-Murphy S. B., Saito M., (authors). **Advances in polymer science**. New York: Springer-Verlag. 1987. p. 57-192.
- COOLBEAR, K. P.; ELGAR, D. F.; AYERS, J. S. Profiling of genetic variants of bovine k-casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 1055-1068, 1996.
- DAMODARAN, S. Functional properties. In S. Nakai & H. W. Modler (Eds.), **Food proteins: properties and characteristics**, New York: VCH Publ. 1996. p. 167-234.
- DELBEN, F.; STEFANCICH, S. Interaction of Food Proteins with Polysaccharides I: properties upon Mixing. **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 325-346, 1997.

DELFOUR, A.; JOLLES, J.; ALAIS, C.; JOLLES, P. Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, p. 452-455, 1965.

DICKINSON, E. **An Introduction to Food Colloids**. Oxford:Oxford Science Publishers. 1992.

DOUBLIER, J.-L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, p. 202–214, 2000.

DOUCET, D.; GAUTHIER, S. F.; FOEGEDING, E. A. Rheological characterisation of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 711–715, 2001.

EGELANDSDAL, B.; FRETHEIM, K.; HARBITZ O. Dynamic rheological measurements on heat-induced myosin gels: an evaluation of the method's suitability for the filamentous gels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 944-954, 1986.

IKEDA, S.; FOEGEDING, E. A. Effects of lecithin on thermally induced whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 239-244, 1999.

KASAPIS, S.; MORRIS, E. R.; NORTON, L. T.; BROWN, C. R. T. Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems - Part III: phase separation in mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 21, p. 261-268, 1993.

MARSHALL, S. C. Casein macropeptide from whey - A new product opportunity. **Food Research Quarterly**, v. 51, p. 86-91, 1991.

MARTÍN-DIANA, A. B.; FRÍAS, J.; FONTECHA, J. Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 363-367, 2005.

MARTINEZ, M. J.; FARÍAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 860-867, 2011.

MOLLÉ, D.; LEONIL, J. Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LS-ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**, v. 15, p. 419-428, 2005.

MORRIS, V. J. Multicomponent gels. In G. O. Phillips, D. J. Wedlock & Williams, P. A. (Eds.) **Gums and Stabilisers for the Food Industry**, 3 ed., London: Elsevier. 1986. p. 87-99.

MORRIS, V. J. Weak and strong polysaccharide gels. In E. Dickinson (Eds) **Food polymers, gels and colloids**. The Royal Society of Chemistry. 1991. p. 310-321.

NILSSON, S., MUHRBECK, P. Elastic shear modulus of biphasic gels. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 30, p. 681-685, 1992.

PERRECHIL, F. A.; BRAGA, A. L. M.; CUNHA, R. L. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behaviour. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2085-2093, 2009.

PUPPO, M. C.; LUPANO, C. E.; AÑÓN, M. C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2353-2361, 1995.

RELKIN, P.; MEYLHEUC, T.; LAUNAY, B.; RAYNAL, K. Heat-induced gelation of globular protein mixtures. A DSC and scanning electron microscopic study. **Journal of Thermal Analysis**, v. 51, p. 747-755, 1998.

ROCHA, C., TEIXEIRA, J. A., HILLIOU, L., SAMPAIO, P., GONÇALVES M. P. Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1734-1745, 2009.

STADING, M.; HERMANNSON, A. M. Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, v. 4, p. 121-135, 1990.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2. edição. Freeman Press, USA, 1996. p. 294-348.

TROMP, R. H.; RENNIE, A. R.; JONES, R. A. L. Kinetics of the simultaneous phase separation and gelation in solutions of dextran and gelatin. **Macromolecules**, v. 28, p. 4129-4138, 1995.

VAN DEN BERG, L.; VAN VLIET, T.; VAN DER LINDEN, E.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; VAN DE VELDE, F. Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 961-976, 2007.

YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; YI, J. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 907-914, 2011.

CAPÍTULO 5**ESTRUTURA SECUNDÁRIA E MUDANÇAS NA CRISTALINIDADE DOS
GÉIS DE CASEINOMACROPEPTÍDEO NA PRESENÇA DE
CARBOXIMETILCELULOSE**

RESUMO

Análises no infravermelho (FTIR) e difração de raios-X foram usadas para caracterizar a estrutura secundária do caseinomacropeptídeo (CMP) e mudanças microestruturais com adição de carboximetilcelulose nos géis em pH 2. Os resultados demonstram que o peptídeo apresenta estrutura secundária pouco organizada, formada por α -hélice, folha- β (maior porção) e voltas- β . O grau de cristalinidade das amostras gel foi maior que na amostra não gelificada, ocorrendo um aumento mais significativo na presença de CMC, devido à maior organização microestrutural. Ocorreu também acréscimo no grau de opacidade com adição do peptídeo.

5.1 INTRODUÇÃO

A estrutura secundária de biopolímeros define a sua função biológica, bem como suas propriedades tecnológicas como hidratação e emulsificação, entre outras. De acordo com o sistema, proteínas podem adotar diferentes estruturas secundárias influenciadas pela presença de sais, pH, temperatura, entre outros (FABIAN et al., 1993; CHEHÍN et al., 1999). A estrutura secundária pode mudar também com o estado físico do meio: gel, solução, filme (ALLAIN; PAQUIN; SUBIRADE, 1999; LEFÈVRE; SUBIRADE, 2000; SUBIRADE; GUÉGUEN; PÉZOLET, 1994; SUBIRADE et al., 1998). Em todas essas situações, a técnica de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier tem sido bem aplicada para avaliar a estrutura secundária de proteínas.

O grau de cristalinidade definido como a fração volumétrica da fase cristalina é de importância fundamental para definição de propriedades químicas e físicas de polímeros semicristalinos, influenciando de forma direta no comportamento mecânico dos materiais e na sua opacidade. Sabe-se que quanto maior o grau de cristalinidade menos transparente tende a ser o polímero e à medida que esse parâmetro aumenta o módulo elástico, a resistência ao escoamento e a dureza também crescem (VAN VLACK, 1988).

Inúmeros métodos podem ser usados para avaliar o grau de cristalinidade, entre eles calorimétricos (DSC – calorimetria diferencial de varredura, DTA – análise diferencial térmica), espectroscopia (FTIR – análise por absorção de infravermelho com transformada de Fourier) e técnicas de raios-X. Existem diferenças físicas e de ordem cristalina nesses métodos (RYAN et al, 1996). A difração de raios-X (DRX) é utilizada inclusive para determinar o tamanho e perfeição dos cristais, orientação, ordem e empacotamento e na investigação de arranjos atômicos ou moleculares (MOFFATT; PEARSALL; WULFF, 1972).

O presente capítulo teve como objetivo a análise da estrutura secundária do caseinomacropéptido, bem como das mudanças microestruturais ocasionadas por carboximetilcelulose nos géis em pH 2, por meio de técnicas de FTIR e difração de raios-X.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

Os ensaios foram realizados utilizando: (i) BioPURE-GMP® caseinomacropeptídeo (CMP) fornecido por DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA). A composição do CMP foi de: proteína (base seca) 82,5% (m/m) (N x 6,47), sendo CMP 90,0% (m/m) (N x 7,07) da proteína total, 0,5% (m/m) gordura, 6,0% (m/m) cinzas e umidade. (ii) carboximetilcelulose (30 FGH – 70520, com alto grau de substituição e alta viscosidade) fornecido pela International Speciality Products - Brasil.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Preparo das amostras

Soluções estoque do peptídeo e do polissacarídeo foram preparadas em água purificada Milli-Q e armazenadas por 24 h para completa dissolução. Posteriormente, foram adequadamente misturadas para obter as concentrações necessárias de CMP (4, 6 e 8%) e CMC (0, 0,25 e 0,5%) nos sistemas. O pH (2) foi ajustado com HCl e NaOH 1 N. Os géis foram designados como G1 (4% de CMP e 0% de CMC), G2 (4% de CMP e 0,25% de CMC), G3 (4% de CMP e 0,5% de CMC), G4 (6% de CMP e 0% de CMC), G5 (6% de CMP e 0,25% de CMC), G6 (6% de CMP e 0,5% de CMC), G7 (8% de CMP e 0% de CMC), G8 (8% de CMP e 0,25% de CMC) e G9 (8% de CMP e 0,5% de CMC).

5.2.2.2 Espectrometria no infravermelho (FTIR)

A análise do espectro no infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) foi realizada por mistura de 150 mg de KBr (para IR spectroscopy, Merck Chemicals International) com 3 mg da amostra liofilizada. Esse material foi colocado dentro de um conjunto formatador, sendo as pastilhas formatadas com auxílio de uma prensa hidráulica, sob pressão de 8 ton/cm^2 por 5 minutos.

Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro por transformada de Fourier (FTIR) BioRad modelo FTX 3500 (Hercules, CA, USA), com fonte MIR de carbeto de silício, Beam splitter MIR (KBr estendido), detector MIR DTGS (sulfato de triglicina deuterada) e função de Apodização Blackman-Harris 3-Term, onde foram realizadas 32 varreduras por amostra com resolução de 4 cm^{-1} .

Para estimar a estrutura secundária do CMP foi utilizado ajuste da curva da banda de amida I. Os parâmetros necessários para o ajuste, tais como: número e posição de bandas foram obtidos pela técnica de deconvolução e segunda derivada. A análise deconvolutiva reduz a largura das bandas e aumenta a resolução dos espectros, assim é possível visualizar bandas antes não observadas. Com o cálculo da segunda derivada são identificados os números de ondas das novas bandas, as posições dessas servem de parâmetro de entrada para o ajuste da curva para a banda de amida I original (SUREWICZ, MOSCARELLO, MANTSCH, 1987).

Aplicou-se o ajuste de curva para estimar a estrutura secundária do CMP, na região 1800 a 1600 cm^{-1} , a qual corresponde à banda de amida I. O método baseia-se nos mínimos quadrados e calcula as proporções dos componentes lorentzianos da banda de amida I, resultando em um espectro teórico com melhor ajuste ao espectro experimental (BYLER; SUSI, 1986). O software utilizado foi Origin 8.0.

5.2.2.3 Difração de raios – X (DRX)

As amostras liofilizadas foram analisadas em difratômetro Shimadzu XRD-7000 do Laboratório de Óptica de Raios X e Instrumentação da Universidade Federal do Paraná. O equipamento foi programado para operar em regime similar ao descrito por Lutz et al. (2008): tubo de raio-X com ânodo de cobre (20 mA e 40 kV), onde varreduras contínuas foram realizadas nas amostras na faixa de 5 a 40°, em ângulo de 2 θ , à velocidade de 1°/min e campo de amostragem de 0,02°. Os espectros foram obtidos em software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA) e os valores de cristalinidade foram calculados de acordo com a equação 22:

$$\text{Cristalinidade (\%)} = I_c / (I_a + I_c) \times 100 \quad (22)$$

onde:

I_a = área região amorfa do difratograma

I_c = área cristalina do difratograma

5.2.2.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância e teste de média de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do software Statistica 7.1 (STATSOFT, Michigan, USA) e os gráficos obtidos pelo programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Estrutura secundária do CMP

De acordo com a Tabela 7 e Figura 36, a banda de amida I está assimétrica e centrada em aproximadamente 1640 cm^{-1} , indicando que o CMP possui estrutura predominante do tipo folha- β , o que se confirma por uma maior área para essa banda. Tem-se contribuição α -hélice em 1657 e 1682 cm^{-1} , já em 1693 cm^{-1} voltas- β , para 1743 cm^{-1} não há atribuição. Esses resultados são condizentes com Ono et al. (1987), que descrevem o CMP como estrutura pouco organizada, formada por α -hélice, folha- β (maior porção) ou voltas- β , sendo que tanto a para- κ -caseína como CMP têm pouca alteração em sua estrutura secundária após a clivagem com quimosina.

Tabela 7. RESULTADOS PARA AJUSTE DAS CURVAS NA REGIÃO $1800\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$

	Área	Centro	Amplitude	Altura
1	57,94	1640,69	89,11	0,41
2	1,09	1743,81	53,02	0,01
3	28,02	1657,66	83,04	0,21
4	8,51	1682,21	41,53	0,13
5	0,76	1693,83	14,04	0,03

De acordo com Kumosinski, Brown e Farrell Jr. (1993), os sítios de glicosilação, Thr-133, e de fosforilação, Ser-149 e Thr-145, estão localizados na região com contribuição voltas- β .

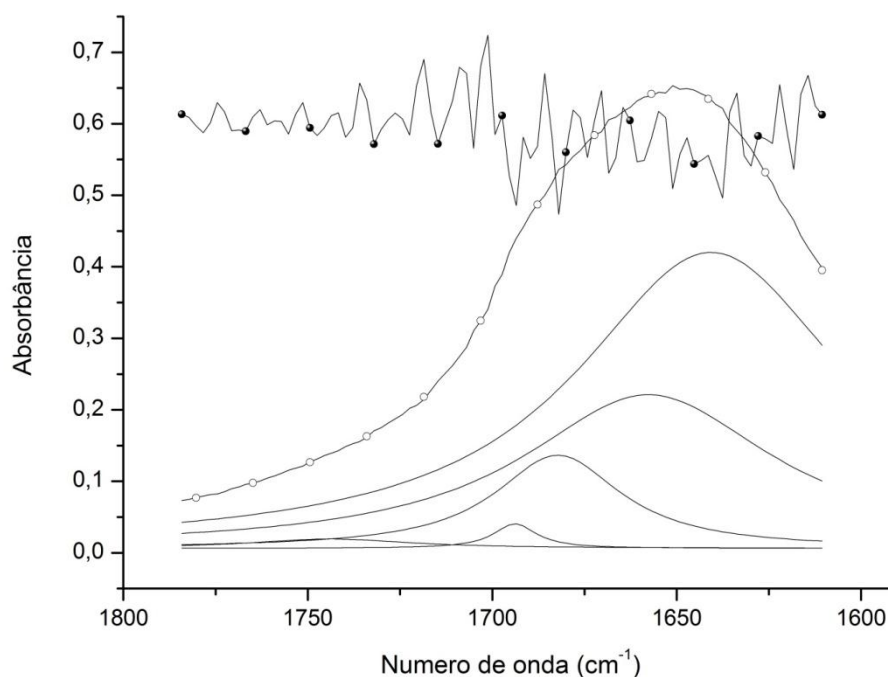


FIGURA 36 – SINAL SIMULADO (-o-) BASEADO EM ESPECTRO DE CMP COM ESTRUTURA PREDOMINANTE EM FOLHA β , 2ª DERIVADA (-●-) E OS COMPONENTES INDIVIDUAIS DO AJUSTE (—)

5.3.2 Difração de raios – X (DRX)

Quando os raios-X interagem com um material cristalino geram um padrão de difração, sendo que cada componente tem seu padrão, único e representa a sua identidade. Quanto maior o número de cristais em um plano de uma estrutura, mais intensos, pontiagudos e estreitos serão os picos no difratograma. A parcela amorfa gera picos mais largos e menores (BAUMHARDT NETO, 2003).

Os padrões de DRX do peptídeo e do polissacarídeo são apresentados na Figura 37. CMC é caracterizado por um único pico em 2θ a aproximadamente 20° e CMP por um pico principal em 2θ de 38° e picos

secundários em 2θ próximos a 10° e 20° . Nesses picos secundários de CMP é possível observar a presença de ruídos o que leva a uma definição limitada, característico de uma matriz amorfa. Contudo o pico principal mais intenso e bem definido caracteriza a porção cristalina do polímero. O único pico apresentado no difratograma de CMC é característico da região cristalina.

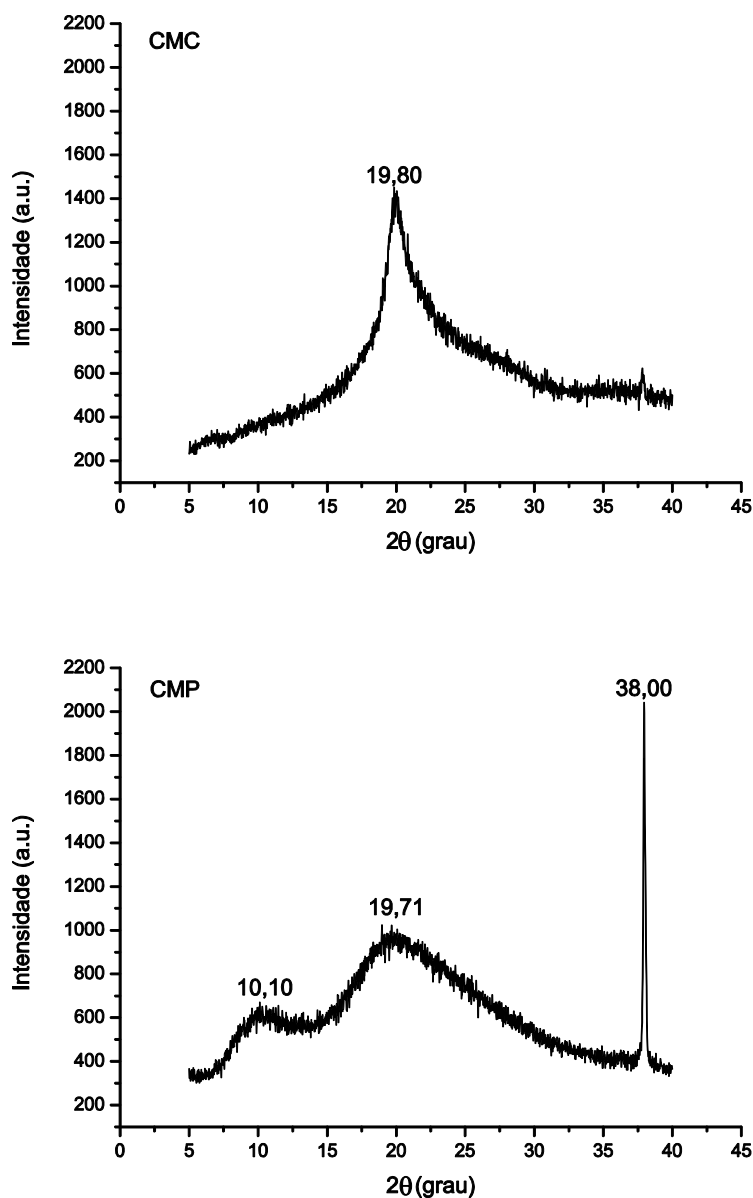


FIGURA 37 – DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA CMC E CMP

Os difratogramas das Figuras 38, 39 e 40 demonstram que os géis, assim como o CMP não gelificado, apresentaram região cristalina em 2θ de aproximadamente 38° . A permanência desse pico nos difratogramas das amostras gelificadas demonstra a ausência de ligações covalentes e de hidrogênio na formação da rede do gel. Como também foi constatado para os valores de n (Capítulo 3) nos espectros mecânicos dessas amostras.

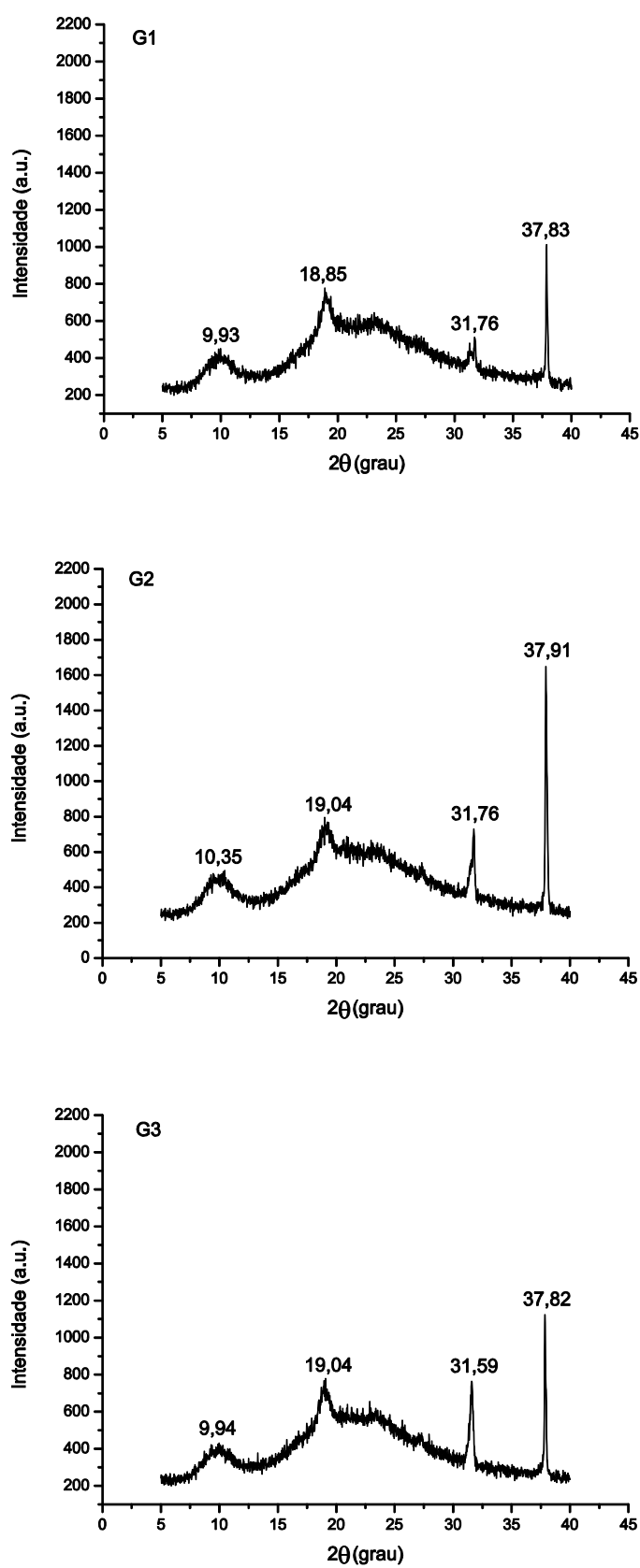


FIGURA 38 – DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA G1, G2 E G3

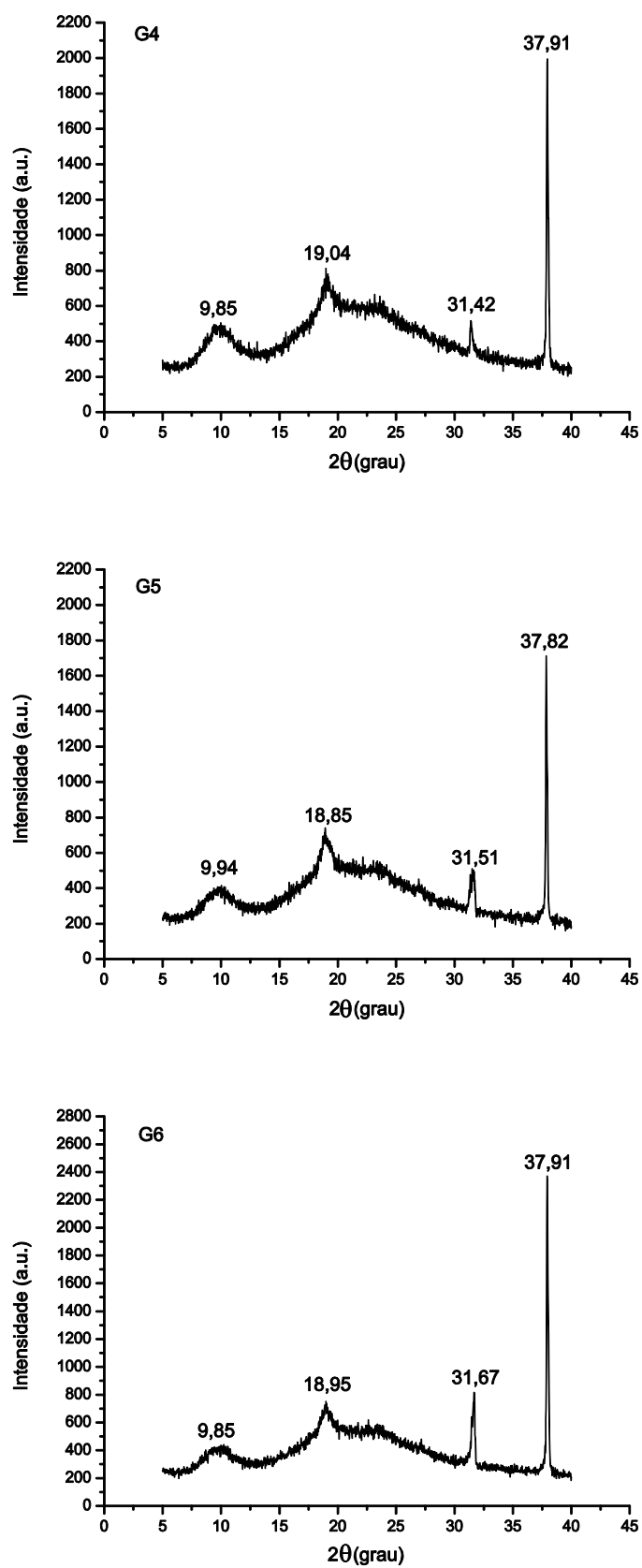


FIGURA 39 – DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA G4, G5 E G6

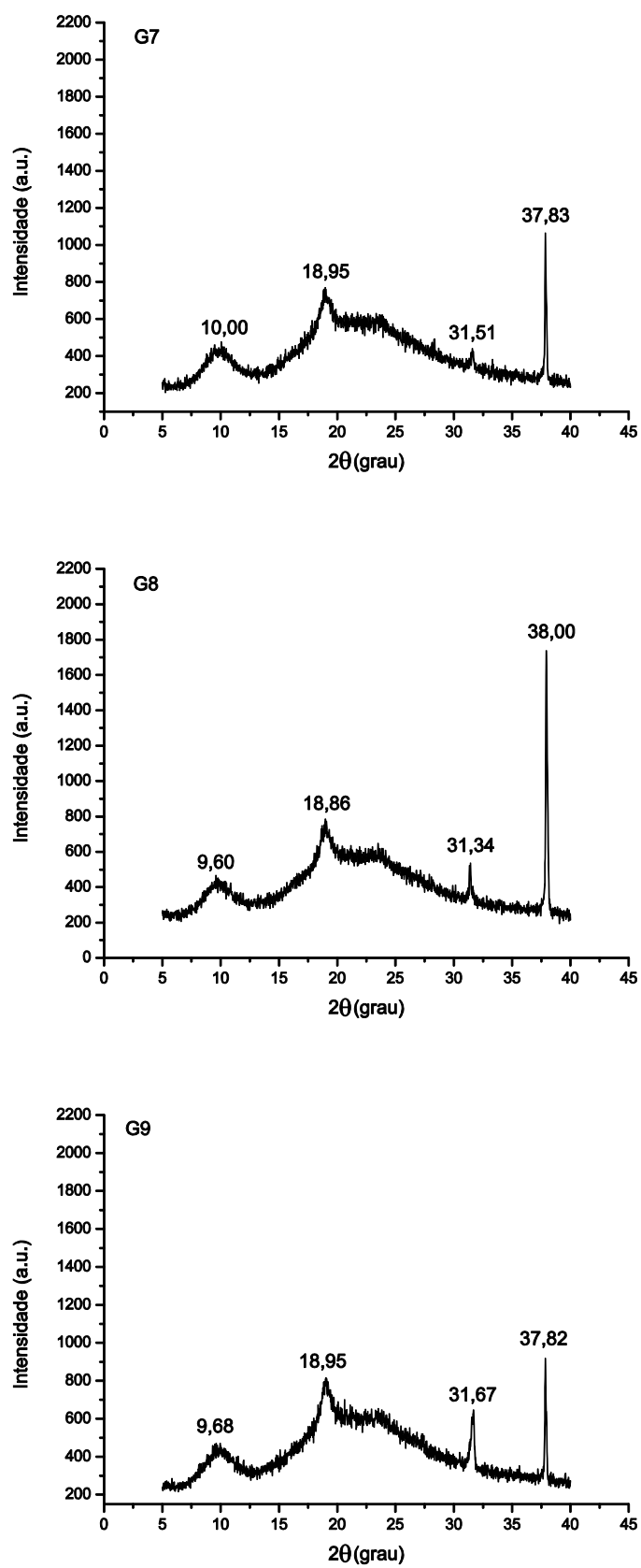


FIGURA 40 – DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA G7, G8 E G9

Um novo pico a 2θ em aproximadamente $31,59^\circ$ aparece nas amostras gelificadas. Nas demais amostras com adição de CMC G2, G3, G5, G6, G8 e G9 esse pico também está presente, sendo mais intenso na presença do polissacarídeo. Sabe-se que a intensidade do pico é diretamente proporcional ao grau de cristalinidade (ALEXANDER, 1969), o que explica um aumento geral na intensidade dos picos nas amostras com CMC.

Na Tabela 8 encontram-se os níveis de cristalinidade calculados para os componentes puros (CMP e CMC) e para os géis (G1-G9). Os valores foram obtidos a partir da relação da área de difração do pico com a área de difração total. Ocorreu aumento no grau de cristalinidade das amostras gel sem adição de CMC (G1, G4 e G7) em relação ao CMP não gelificado. Isso se explica devido ao arranjo necessário para a construção da rede tridimensional formando zonas de junção, o que aumenta o grau de organização nessas amostras em relação à forma não gelificada, tornando as cadeias mais rígidas.

Tabela 8. GRAUS DE CRISTALINIDADE E OPACIDADE PARA AS AMOSTRAS

Amostra	% Cristalinidade*	% Opacidade*
G1	17,09±0,32 ^d	8,35±0,08 ^e
G2	19,92±0,42 ^{bc}	9,13±0,13 ^{de}
G3	17,58±0,34 ^d	9,83±0,07 ^d
G4	19,08±0,25 ^c	11,45±0,16 ^c
G5	20,32±0,32 ^b	11,98±0,22 ^c
G6	22,00±0,44 ^a	13,76±0,12 ^b
G7	15,71±0,30 ^e	12,07±0,37 ^c
G8	19,15±0,21 ^{bc}	14,29±0,07 ^b
G9	17,38±0,35 ^d	15,14±0,17 ^a
CMC	15,25±0,49 ^e	
CMP	14,97±0,62 ^e	

*Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). G1 (4% de CMP e 0% de CMC), G2 (4% de CMP e 0,25% de CMC), G3 (4% de CMP e 0,5% de CMC), G4 (6% de CMP e 0% de CMC), G5 (6% de CMP e 0,25% de CMC), G6 (6% de CMP e 0,5% de CMC), G7 (8% de CMP e 0% de CMC), G8 (8% de CMP e 0,25% de CMC) e G9 (8% de CMP e 0,5% de CMC).

O aumento no grau de cristalinidade das amostras adicionadas do polissacarídeo é devido a uma maior organização ou empacotamento das cadeias do peptídeo na presença de CMC, o que resultou em uma taxa de gelificação maior na presença do polissacarídeo (Capítulo 4). Esse empacotamento ocorre para evitar contato com as moléculas de CMC, demonstrando a incompatibilidade termodinâmica entre os componentes em pH 2, que resultou em separação de fase, como já constado nos resultados obtidos para reologia dinâmica, espectrofotometria e microscopia no capítulo 4. Em condições de compatibilidade, há uma diminuição na cristalinidade, conforme observado por Xu et al. (2010).

O aumento no grau de cristalinidade resulta em um acréscimo na opacidade dos materiais (Tabela 8), isso porque a organização mais densa das cadeias dificulta a permeabilidade da luz. Em pastas de amido, uma maior organização granular também resultou em maior opacidade e consequente dificuldade à passagem da luz (CRAIG et al., 2005). Os géis apresentaram valores de opacidade maiores que 8%, sendo que a adição de CMC resultou em acréscimo desse parâmetro. Adição de um polissacarídeo (goma xantana) também influenciou a opacidade de géis de proteína isolada de soro de leite (desnaturado em temperatura de 80°C) obtidos com adição de 200 mM de NaCl, resultando num aumento desse parâmetro (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000).

5.4 CONCLUSÃO

CMC e CMP possuem picos característicos em 2θ a aproximadamente 20° para o polissacarídeo e 38° , 10° e 20° para CMP. As amostras gelificadas apresentaram maior grau de cristalinidade, sendo que esse parâmetro foi maior na presença de CMC, devido à maior organização microestrutural. Paralelamente, ocorreu também aumento no grau de opacidade com adição de carboximetilcelulose.

Agradecimentos

À pesquisadora Lucimara A. Forato do Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento da Instrumentação Agropecuária CNPDIA - EMBRAPA – São Carlos – SP, Grazielli da Rocha – Laboratório de Espectroscopia Vibracional de Infravermelho – Departamento de Química - UFPR, Prof. Irineu Mazzaro do Laboratório de Óptica e raios-X – Departamento de Física - UFPR.

REFERÊNCIAS

- ALLAIN, A. -F.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Relationships between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel state as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 337-344, 1999.
- ALEXANDER, L. E. **X-Rays diffraction methods in polymer science**, John Wiley & Sons Inc., New York, 1969.
- BAUMHARDT NETO, R. Raio-X. In **Técnicas de Caracterização de polímeros**. CANEVAROLO JR., S.V., Ed. São Paulo: Artiber Editora, p. 41-60, 2003.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, v. 14, pp. 383-390, 2000.
- BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**, v. 25, pp. 469-487, 1986.
- CHEHÍN, R.; ILORO, I.; MARCOS, M. J.; VILLAR, E.; SHNYROV, V. L.; ARRONDO, J. L. R. Thermal and pH-induced conformational changes of a β -sheet protein monitored by infrared spectroscopy. **Biochemistry**, v. 38, p.1525-1530, 1999.
- CRAIG, S. S. S.; MANINGAT, C. C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. A. S.; MATTTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 268-273, 2005.
- FABIAN, H.; SCHULTZ, C. S.; NAUMANN, D.; LANDT, O.; HAHN, U.; SAENGER, W. Secondary structure and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T1 in aqueous solution. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, p. 967-981, 1993.
- KUMOSINSKI, T. F.; BROWN, E. M.; FARRELL JR., H. M. Three-Dimensional Molecular Modeling of Bovine Caseins: A Refined, Energy-Minimized κ -Casein Structure. **Journal Dairy Science**, v. 76, pp. 2507-2520, 1993.
- LEFÈVRE, T.; SUBIRADE, M. Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate gels. **Biopolymers**, v. 54, p. 578-586, 2000.
- LUTZ, R.; ASERIN, A.; WICKER, L.; GARTI, N. Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups. **Foods Hydrocolloids**, v. 22, p. 239-247, 2008.

MOFFATT W G, PEARSALL G W, WULFF, J. **Ciência dos Materiais**. v.1. Rio de Janeiro: Editora LTC, 1972.

ONO, T.; YADA, R.; YUTANI, K.; NAKAI, S. Comparison of conformations of κ -casein, para- κ -casein and glycomacropeptide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 911, p. 318-325, 1987.

RYAN, A. J.; STANFORD, J. L.; BRAS, W; NYE, T. M. W. A synchrotron X-ray study of melting and recrystallization in isotactic polypropylene. **Polymer**, v. 38, p. 759-768, 1996

SUBIRADE, M.; GUÉGUEN, J.; PÉZOLET, M. Conformational changes upon dissociation of a globular protein from pea: a Fourier transform infrared spectroscopy study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, p. 239-247, 1994.

SUBIRADE, M.; KELLY, I.; GUÉGUEN, J.; PÉZOLET, M. Molecular basis of film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 241-249, 1998.

SUREWICZ, W. K.; MOSCARELLO, M. A.; MANTSCH, H. H. Lipide-induced Changes in the Secondary Structures to Snake Venom Cardiotoxins. **The Journal of Biological Chemistry Biochemistry**, v. 26, p. 3881-3886, 1987.

VAN VLACK, L H. **Princípios de ciências e tecnologia dos materiais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, 1988.

XU, D.; ZHAO, M.; REN, J.; LI, G.; LIAO, Z. Investigation of interactions in 4-aminosalicylic acid/polysaccharide in aqueous media. **Food Research International**, v. 43, p. 2077-2080, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

Todas as amostras em pH 2 formaram gel. Em pH 4 houve formação de coacervados e complexos solúveis, o que demonstra interação positiva entre CMP e CMC. Em pH 6,5 também houve interação, inclusive com aumento da viscosidade nos sistemas adicionados de CMC, sendo que o comportamento reológico mudou de dilatante para pseudoplástico na presença do polissacarídeo. O método espectrofotométrico confirmou a interação entre CMP-CMC nos referidos pHs, sendo essa interação puramente eletrostática, conforme resultados obtidos para FTIR.

O tempo de relaxação transversal (T_2) das moléculas de água foi alterada com o polissacarídeo. Em pH 2, a adição de CMC reduziu os valores de T_2 . No entanto, dependendo da concentração houve efeito plastificante, o que resultou em aumento do volume livre nos géis e por conseguinte de T_2 . A formação de coacervados em pH 4 resultou em menor interação da água com os componentes. Em pH 6,5, a adição de CMC resultou em aumento na mobilidade das moléculas de água, devido à ligações fracas com o polissacarídeo.

A presença de CMC resultou em uma maior taxa de gelificação nas amostras em pH 2, também houve um aumento na opacidade. Os géis com concentração de 6% e 8% de CMP adicionados do polissacarídeo apresentaram separação de fases, como consequência estrutura frágil e menor capacidade de retenção de água. No entanto, nas amostras com fase única, o polissacarídeo parece contribuir para melhora das propriedades.

O peptídeo apresentou estrutura secundária desorganizada, com contribuições α -hélice, folha- β (maior porção) e voltas- β . A difração de raios-X mostrou que o CMC e CMP possuem picos característicos em 2θ a aproximadamente 20° para o polissacarídeo e 38, 10 e 20° para CMP. As amostras gelificadas apresentaram maior grau de cristalinidade, sendo que esse parâmetro foi maior na presença de CMC, devido à maior organização microestrutural. Paralelamente, ocorreu também aumento no grau de opacidade com adição de carboximetilcelulose.

ANEXOS

ANEXO 1	FICHA TÉCNICA DO CASEINOMACROPEPTÍDEO.....	155
ANEXO 2	FICHA TÉCNICA DA CARBOXIMETILCELULOSE.....	158

ANEXO 1 - FICHA TÉCNICA DO CASEINOMACROPEPTÍDEO



DAVISCO
FOODS INTERNATIONAL, INC.®

Glycomacropeptide (GMP)

Product Description

Glycomacropeptide (GMP) is isolated from fresh cheese whey. The powder is light colored, homogeneous, and free flowing. The flavor of the product is clean, and bland.

Analysis*	Specification	Typical Range	Test Method
Moisture (%)	7.0 max.	6.0 ± 0.9	Vacuum Oven
Glycomacropeptide (N x 7.07) (% Dry Basis)	90.0 min.	91.0 ± 1.0	Leco Combustion
Protein (N x 6.47) (% Dry Basis)	82.5 min.	83.5 ± 1.0	Leco Combustion
Fat (%)	1.0 max.	0.5 ± 0.3	Mojonnier
Ash (%)	7.0 max.	6.3 ± 0.5	Residue on Ignition
Lactose (%)	1.0 max.	< 0.5	Enzymatic Assay
pH	7.0 max.	6.4 ± 0.2	10% Sol. @ 20°C.
Scorched Particles (mg/25g)	15.0 max	7.5	ADPI

Microbiological Profile

	Specification	Typical Range	Test Method
Aerobic Plate Count	10,000/g max.	< 2,500	Standard Methods**
Coliform (MPN)	10/g max.	< 10	FDA/BAM
<i>E. coli</i> (MPN)	Negative/g	Negative	FDA/BAM
Yeast & Mold	10/g max.	≤ 10	Standard Methods**
Coag. Pos. Staph (MPN)	< 10/g	< 10	FDA/BAM
Salmonella sp.	Negative/375 g	Negative	AOAC / ELISA
Listeria sp.	Negative/25 g	Negative	AOAC / ELISA

* All results reported on "AS IS" basis except where noted.

** Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th Edition.

Storage and Packaging

Dried dairy products can absorb odors and moisture. Therefore, adequate protection is essential. Shelf life will be enhanced through ideal storage conditions which include temperatures below 25°C., relative humidity below 65%, and an odor free environment. Avoid less than ideal storage conditions.

Packaged in Kraft multiwall bags incorporating a polyethylene bag liner, individually closed.

Net wt: 20 Lbs.

Version: 07J-1001

Davisco Foods International, Inc.
11000 West 78th Street, Suite 210, Eden Prairie, MN 55344
PHONE 952-914-0400 FAX 952-914-0887
www.DaviscoFoods.com

Glycomacropeptide (GMP)

Nutrient Information

Expressed per 100 grams product, as is.

Calories	355
Calories from fat	5
Total Fat	0.5 g
Saturated Fat	0.2 g
Trans Fat	0.0 g
Cholesterol	<1.0 mg
Sodium	2000.0 mg
Potassium	450.0 mg
Total Carbohydrates	7.5 g
Dietary Fiber	0.0 g
Sugars	0.5 g
Sialic Acid	7.0 g
Protein (N x 6.47)	80.0 g
Vitamin A	<100 IU
Vitamin C	<2 mg
Vitamin D	<8 IU
Iron	5.0 mg
Calcium	660.0 mg
Phosphorus	490.0 mg
Magnesium	130.0 mg
Moisture	6.0 g
Ash	6.0 g

Amino Acid Profile

Expressed per grams on a protein basis

Alanine	5.5 g
Arginine	0.5 g
Aspartic Acid	8.6 g
Cysteine	0.1 g
Glutamic Acid	20.5 g
Glycine	1.1 g
Histidine*	0.3 g
Isoleucine*‡	10.1 g
Leucine*‡	2.6 g
Lysine*	5.9 g
Methionine*	1.8 g
Phenylalanine*	0.5 g
Proline	12.5 g
Serine	6.1 g
Threonine*	15.8 g
Tryptophan*	0.0 g
Tyrosine	0.1 g
Valine*‡	8.0 g

* Essential Amino Acid

‡ Branched Chain Amino Acid

Nutrition and amino acid profiles are provided for informational purposes only. These results are generated using limited sample quantity and Davisco Foods International makes no guaranty that these results will accurately reflect the values of individual lots. Customers should request samples of specific lots for their own analysis if lot specific results are needed.

Version 071-1019



DAVISCO
FOODS INTERNATIONAL, INC.®

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Customer Name Universidade Federal do Parana
(UFPR)

Product Name Glycomacropeptide (GMP)

Packaging 20 Lb Bags
Report Date 8/31/2010

Lot #	JE 002-0-940
GMP, (Nx7.07) % Dry Basis	91.2
Protein, (Nx6.47) % Dry Basis	83.5
Fat, %	0.3
Ash, %	6.3
Moisture, %	6.1
pH, (10% @ 20C)	6.2
Scorched Particles/25 g	7.5
Aerobic Plate Count/g	<250
E. coli/g (MPN)	Negative
Coliform/g (MPN)	<10
Yeast & Mold/g	<10
S. aureus/g (MPN)	<10
Salmonella/375g	Negative
Listeria/25 g	Negative

Approved By:


Quality Assurance

Davisco Foods International, Inc.
620 North Main, Le Sueur, MN 56058
PHONE 507-665-8861 FAX 507-665-8869

ANEXO 2 - FICHA TÉCNICA DA CARBOXIMETILCELULOSE

FICHA TÉCNICA DE PRODUTO ACABADO – ISP DO BRASIL

70520 – CMC 30 FGH



Emissão: 03/2005

Descrição:

O CMC 30 FGH é um espessante / estabilizante de coloração amarela, apresentado em pó fino, obtido por processamento tecnológico adequado, sem sujidades ou materiais estranhos, próprio para uso em preparações alimentícias.

Propriedades:

Físico-Químicas:

Atributo	Tolerância	Metodologia
1. Aspecto	Pó fino amarelo	I.INSP.06
2. Umidade	Máximo 8,00%	I.INSP.28
3. Viscosidade (sol. 1%)	3000 – 4000 cp	I.INSP.29
4. pH (sol. 1%)	6,50 – 8,50	I.INSP.21

Aplicação:

O CMC 30 FGH deve ser adicionado na proporção de 0,5% sobre a massa de queijo fresco a ser fundida.

Para maiores informações consulte nossa equipe.

Embalagem:

Apresentado em saco de papel Kraft revestido internamente com saco de polietileno contendo 25kg do produto, corretamente fechado e identificado.

Transporte:

Deve ser realizado em veículo totalmente seco, que não seja utilizado para transporte de outras mercadorias que possam colocar em risco ou contaminar o produto com odores ou substâncias estranhas a sua composição, ao abrigo da chuva, luz solar direta, e sujidades.

Armazenagem:

Armazenar em local fresco, seco e ventilado ao abrigo da luz solar direta e protegidos de insetos e roedores.

Validade:

365 dias a partir da data de fabricação indicada no rótulo, nas condições originais de embalagem e seguidas as recomendações de transporte e armazenagem descritas neste documento.

Obs: Como o emprego deste produto está fora do controle da Germinal, todas as recomendações e sugestões de uso são oferecidas sem compromisso. As informações contidas neste documento e os vários produtos aqui descritos são indicados para uso somente por pessoas que possuam capacitação técnica, sob própria responsabilidade e risco, e após terem sido executadas as análises técnicas, avaliações e testes necessários sobre produtos e seus usos. Apesar das informações aqui contidas serem confiáveis nós não podemos garantir sua exatidão. O cliente deve conduzir suas próprias determinações de adequação dos produtos às suas necessidades, à proteção do meio ambiente, à saúde e segurança de seus empregados, e de seus produtos.

Nem a ISP nem seus afiliados devem ser responsabilizados pelo uso desta informação, ou de qualquer produto, método, ou equipamento descrito neste documento. Nada aqui renuncia a nenhuma condição de venda da ISP ou seus afiliados, e NÓS NÃO GARANTIMOS, EXPRESSA OU IMPLICITAMENTE, A COMERCIALIZAÇÃO OU ADEQUAÇÃO DE NENHUM PRODUTO PARA UM USO OU PROPÓSITO PARTICULAR. Nós também não fazemos nenhuma garantia sobre infração de nenhuma patente relacionada ao uso por clientes de nenhum produto descrito neste documento. A Germinal reserva-se ao direito de efetuar alterações e/ou revisões sem aviso prévio.